

Charakterisierung heptahelikaler Rezeptoren in *Aspergillus fumigatus*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Diplom-Biologe **Alexander Gehrke**
geboren am 11. April 1978 in Peine

Gutachter

1. Prof. Axel A. Brakhage , Jena
2. Prof. Erika Kothe, Jena
3. Prof. Hubertus Haas, Innsbruck

Tag der öffentlichen Verteidigung: 26. Januar 2009

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	1
<i>Aspergillus fumigatus</i> – Saprophyt und Pathogen	1
Signalwahrnehmung, Signaltransduktion und Zellantwort	3
Intrazelluläre Signalweiterleitung – eine kurze Übersicht	4
Sensierung von Stress	6
Heterotrimere G-Proteine, cAMP und Proteinkinase A	6
G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	10
Ziele der Arbeit	12
B. Material – Methoden	13
Mikrobiologische Methoden	13
Molekularbiologische Methoden	17
Proteinchemische Methoden	24
Mikroskopie & Photographie	28
Virulenzstudien	29
Chemikalien und Enzyme	29
C. Ergebnisse	30
Identifizierung putativer GPCRs in <i>A. fumigatus</i>	30
Identifizierung von Transmembranrezeptoren	30
PTH11-ähnliche Transmembranrezeptoren	34
Charakterisierung putativer GPCRs in <i>A. fumigatus</i>	36
Deletion der heptahelikalen Rezeptoren GprC und GprD	39
Mikrobiologische Charakterisierung der Deletionsmutanten	42
<i>gprC</i> - und <i>gprD</i> -Expressionsanalyse	47
Sensitivitätsstudien der <i>gprC</i> - und <i>gprD</i> -Deletionsmutanten	48
Expressionsanalysen der Stressantwort	53
Hitzeantwort in <i>A. fumigatus</i>	55
eGFP-Lokalisationsstudien	56
Virulenzstudien mit <i>gprC</i> - / <i>gprD</i> -Deletionsmutanten	61
Transkriptomanalyse der Δ GprC und Δ GprD Mutanten	66
Proteomanalyse der Deletionsmutanten	77
D. Diskussion	79
G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) in <i>A. fumigatus</i>	79
Pheromonrezeptoren in einem Deuteromyceten	80
Sind GprC und GprD Kohlenhydratrezeptoren?	80
cAMP-Rezeptoren sensieren Aminosäuren	83
Prostaglandinrezeptoren – Kommunikation zwischen Wirt und Pathogen?	83
Eine Klasse Pezizomycota-spezifischer GPCRS: PTH11	85
GprC-eGFP hat eine GPCR-typische Lokalisation	85
Polaritätsdefekte in den Mutanten	87
Was regulieren die beiden Rezeptoren GprC und GprD?	89
E. Literaturverzeichnis	94
F. Zusammenfassung / Abstract	102
Eigenständigkeitserklärung	104
Danksagung	106
Anhang	107

A. Einleitung

Aspergillus fumigatus – Saprophyt und Pathogen

„*Aspergillus fumigatus*: Saprophyt oder Pathogen?“ Diese Frage ist zugleich der Titel eines kürzlich erschienenen Übersichtsartikels von Tekaia und Latgé (2005). Häufig wird der Deuteromyzete *Aspergillus fumigatus* einzig unter dem Blickwinkel betrachtet, dass er Erreger von Erkrankungen mit verschiedenen schweren Krankheitsbildern ist.

A. fumigatus ist jedoch in erster Linie ein saprophytischer, filamentöser Schimmelpilz, dessen ökologische Aufgabe im Abbau von organischem Material besteht (Mullins et al., 1976). Die Verbreitung findet über haploide, uninukleäre Konidien statt. Diese werden von Phialiden abgeschnürt, welche ihrerseits auf einer terminal verdickten Zelle, dem Vesikel, gebildet werden. Aufgrund der geringen Größe von 2-3 µm werden die Konidien zum Aeroplankton gezählt (Abb. 1). Der Arname ist auf die rauchgrüne Farbe der asexuellen Sporen (lateinisch *fumus* für Rauch) zurückzuführen.

Als Saprophyt ist *Aspergillus fumigatus* mit einem großen Arsenal an Enzymen ausgestattet, die es dem Organismus erlauben, auf die vielen verschiedenen Umweltanforderungen und verfügbaren Nährstoffe zu reagieren. Hierzu gehören sowohl Enzyme, die dem Abbau zahlreicher Kohlenstoff- und Stickstoffquellen dienen, als auch Proteine, die zur Entgiftung oder zum Schutz vor Schadstoffen nötig sind.

Unter anderem enthält das Genom von *A. fumigatus* mehr als 100 putative Proteine, die als aktive Pumpen schädigende Moleküle, wie z.B. Schwermetalle, aus der Zelle befördern (Tekaia und Latgé, 2005). Eine weitere herausragende Eigenschaft ist die ausgeprägte Thermotoleranz. Konidien überstehen Temperaturen bis 75 °C, das Hyphenwachstum ist bis zu 55 °C möglich (Tansey und Brock, 1978; Ryckeboer et al., 2003). Unter der Berücksichtigung seines natürlichen Habitats ergibt diese Widerstandsfähigkeit Sinn, da z.B. in verrottendem Heu durch mikrobiologische Aktivität Temperaturen erreicht werden, die sogar zur Entzündung

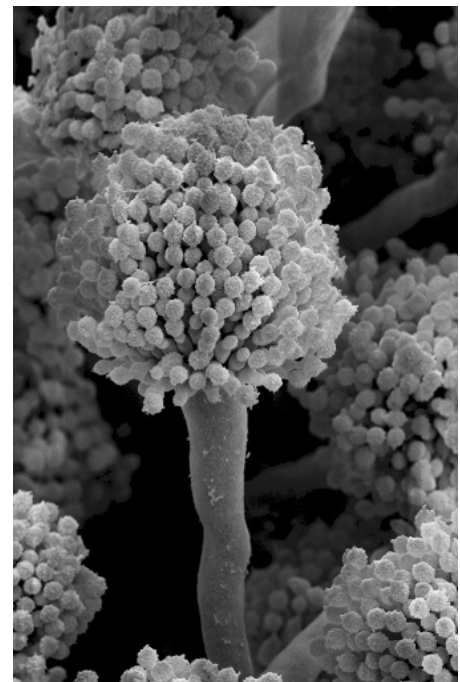


Abbildung 1: REM-Aufnahme eines *A. fumigatus* Konidiophors
(pers. Mitteilung J. Schmalzer-Ripke)

des Heus führen können. Bei Raumtemperatur kann *A. fumigatus* innerhalb einer Woche auf Minimalmedium Kolonien mit einem Durchmesser von mehr als 3 cm bilden. Mit dieser Ausstattung und einem äußerst versatilen Metabolismus versehen kann *A. fumigatus* eine Vielzahl ökologischer Nischen besiedeln.

Eine eher zufällig durch *A. fumigatus* besiedelte ökologische Nische ist der menschliche Körper. Von den gut zweihundert bekannten *Aspergillus*-Spezies ist *A. fumigatus* mit 90 % das am häufigsten vorkommende klinische Isolat (Denning, 1998). Dabei ist es auch interessant hervorzuheben, dass der Anteil der *A. fumigatus*-Sporen in der Umwelt nur einen geringen Anteil an der Gesamtheit ausmacht (Rüchel und Reichard, 1999; Brakhage und Langfelder, 2002). Die durch diese Spezies verursachten Krankheiten reichen von der „Farmer’s lung“, über die allergische, broncho-pulmonale Aspergillose (ABPA) bis zur schwerwiegendsten Manifestation, der invasiven Aspergillose. Zusätzlich, aber weniger häufig, können Infektionen der oberen Atemwege (Sinusitis), der Dermis (kutane Aspergillose), der Ohren (Otitis) oder der Augen (Keratitis) auftreten (Rüchel und Reichard, 1999).

Aufgrund der Luftverbreitung der *A. fumigatus* Konidien atmet jeder Mensch täglich mehrere hundert Sporen dieses Schimmelpilzes ein, wobei gerade die geringe Größe der Konidien (2-3µm) ermöglicht das Vordringen bis in die Alveolen der Lunge ermöglicht. In immunokompetenten Individuen werden die Sporen durch die auf der Lungenoberfläche präsenten Immunzellen, wie z.B. alveolare Makrophagen, zerstört, so dass keine Kolonisation des Gewebes stattfindet (Latgé, 1999).

Ein Risikofaktor für eine Infektion durch *A. fumigatus* ist ein geschwächtes Immunsystem, wie es z.B. bei Patienten nach einer Organtransplantation oder mit akuter Leukämie und einer begleitenden, hoch-dosierten Chemotherapie vorherrscht. Die wachsende Bedeutung von *A. fumigatus* als opportunistischem Pathogen geht demnach einher mit den Fortschritten der Medizin und der damit größer werdenden Gruppe an Patienten, die für eigentlich harmlose Mikroorganismen empfänglich werden (Sanz et al., 2006).

Zur Behandlung von Pilzinfektionen sind derzeit nur wenige Therapeutika vorhanden, die vier Klassen zugeordnet werden können: Polyene, Azole, Fluorcytosine und Echinocandine (Steinbach und Stevens, 2003). Die bei einer anti-mykotischen Behandlung oft auftretenden Nebenwirkungen führen dazu, dass eine Therapie häufig nicht über die nötige Dauer vollzogen werden kann. So kann Amphotericin B, ein Polyen, zu Nierenversagen führen, was die Überlebenschance der betroffenen Patienten beeinträchtigt (Sabra und Branch, 1990).

Spontan auftretende Resistenzen erschweren die Therapie zusätzlich und verleihen der Suche nach Therapeutika mit neuen Angriffspunkten enorme Bedeutung. Resistenzen können auftreten, wenn sich z.B. das Zielmolekül durch spontane Mutation so ändert dass eine Interaktion mit dem Wirkstoff nicht mehr stattfinden kann oder die antifungal wirkende Substanz mittels Transportern aktiv aus der Zelle heraus gepumpt wird (zur Übersicht: Cowen und Steinbach, 2008).

Durch die Veröffentlichung der vollständigen Genomsequenz im Jahr 2005 (Nierman et al.) wurde die Forschung auf molekularbiologischer Ebene mit *A. fumigatus* stark vereinfacht. Zur Identifizierung und Charakterisierung von Virulenzdeterminanten sind gezielte Gendeletionen unabdingbar. Da Silva-Ferreira et al. und Krappman et al. (beide 2006) führten zur schnelleren Erzeugung von Mutanten *A. fumigatus*-Stämme ein, die jeweils eine Deletion einer Untereinheit des „nonhomologous end-joining“-Apparates aufweisen. Dadurch werden Rekombinationsereignisse durch ektopische Integration praktisch eliminiert und die Integration mittels homologer Rekombination bevorzugt.

Signalwahrnehmung, Signaltransduktion und Zellantwort

Jeder Organismus muss auf spezifische Umweltreize reagieren können, um sich z.B. mit anderen Individuen der Population auszutauschen, ein sich änderndes Nahrungsangebot wahrzunehmen oder aber um sich vor einer Bedrohung zu schützen. Die Signalwahrnehmung und -weiterleitung haben gerade bei nicht motilen Organismen oder in der Wechselwirkung zwischen Wirt und Pathogen eine große Bedeutung.

Grundsätzlich gibt es zwei Dinge, die für das Überleben einer Spezies essentiell sind: Fortpflanzung, respektive Vermehrung, und Energiegewinn. Zur sexuellen Reproduktion, bei der sich meistens zwei verschiedene Paarungstypen einer Spezies verbinden, werden zur Erkennung des Partners Pheromone produziert, welche durch spezifische Rezeptoren erkannt werden.

Eines der am besten beschriebenen Systeme stammt aus der Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae*. Zwei membranständige Rezeptoren, Ste2p und Ste3p, sensieren/binden die sezernierten Pheromone des jeweils anderen Paarungstyp. Daraufhin wird über einen heterotrimeren, intrazellulären G-Protein-Komplex das Signal via des G-Protein- β/γ -Heterodimers an eine Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK) weitergeleitet (Bahn et al., 2007) und somit das „mating“-Programm eingeleitet.

Neben Pheromonen wird aber auch eine Vielzahl anderer Signale von Pilzen sensiert. Da Glucose eine der am besten zu verwertenden Kohlenstoffquellen darstellt, besitzen Mikroorganismen mehrere Systeme zur Erkennung und Aufnahme von Glucose bzw. von Hexosen im Allgemeinen, zur Verfügung. Zum einen werden Kohlenhydrate extrazellulär sensiert und das Wachstum mittels erhöhter Proteinkinase A (PKA)-Aktivität daran adaptiert (Xue et al., 1998; Lemaire et al., 2004) und zum anderen wird verfügbarer Zucker über Hexosekinasen und -transporter sowohl sensiert als auch aufgenommen (Rolland et al., 2000).

Ebenso können Aminosäuren als Energiequelle dienen, weshalb dezidierte Systeme zur Erkennung und Aufnahme von Aminosäuren existieren. In *Candida albicans* dient das „general amino-acid sensor system“ bestehend aus drei Untereinheiten (Forsberg und Ljungdahl, 2001) der Erkennung von Aminosäuren und ist zur Entwicklung der vollen Virulenz nötig. Des weiteren ist die „general amino acid permease (GAP)“ zur Verwertung von Aminosäuren vorhanden, die ihrerseits den PKA-Signalweg in Abhängigkeit der Sch9-Kinase aktiviert (Thevelein et al., 2005).

Die Erkennung von Aminosäuren kann auch über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) erfolgen. So ist für *C. albicans* (Maidan et al., 2002) und *Cryptococcus neoformans* (Xue et al., 2006) die Sensierung von Methionin durch Gpr1p, respektive Gpr4p, und eine Aktivierung des PKA-Wegs beschrieben.

Intrazelluläre Signalweiterleitung – eine kurze Übersicht

Die intrazelluläre Weiterleitung kann über mehrere konservierte Signalwege stattfinden. Zu den wesentlichen Elementen dieser Kaskaden zählen unter anderem die Proteinkinase A, Proteinkinase C (PKC), verschiedene Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MPKA, MPKB, HOG1), Ca^{2+} /Calcineurin u.a..

So ist z.B. die Proteinkinase C in *C. albicans* verantwortlich für die Regulation der zellulären Antwort auf Störungen der Zellwandintegrität. Die zugehörigen transmembranen Sensoren sind Wsc1-4p und Mid2p (Popolo et al., 2001). Das Signal wird über einen „Guanine nucleotide exchange“-Faktor (GEF), Rom2p, an ein G-Protein (Rho1p) weitergegeben. Rho1p hat mehrere Zielproteine, so u.a. Proteinkinase C und die $\beta(1-3)$ -D-Glucansynthase-Untereinheiten Fks1p and Fks2p (Popolo et al., 2001).

In dem Modellorganismus *Emmericella (Aspergillus) nidulans* ist die Proteinkinase C an der

Regulation der Biosynthese des Antibiotikums Penicillin beteiligt. Die zelluläre Lokalisation des Transkriptionsfaktors AnBH1, der an der Expression des *aatA*-Gens des Penicillinbiosynthese-Genclusters beteiligt ist, wird durch PKC-Aktivität bedingt. Die Zugabe des Proteinkinase C-Inhibitors Calphostin C oder die Expression von „anti sense“-RNA führt zu zytoplasmatischer Lokalisierung von AnBH1 (Herrmann et al., 2006). Der Zusammenhang zwischen Zellwandintegrität und Produktion von antibakteriellen Sekundärmetaboliten wird hier durch eine mögliche Abwehrreaktion des Pilzes nach einer Schwächung der Zellwand durch mikrobielle Aggressoren erklärt. Eine metabolisch essentielle Rolle der PKC wird ebenfalls diskutiert, da selbst in NHEJ-defizienten Stämmen keine Deletionsmutanten erstellt werden konnten (Herrmann et al., 2006).

Auch Calciumionen spielen als „second messenger“-Moleküle eine wichtige Rolle in eukaryotischen Zellen. Zentrales Protein der Ca^{2+} -Signalkaskade ist Calcineurin, eine Ca^{2+} -Calmodulin-aktivierte Phosphatase mit regulatorischer und katalytischer Untereinheit (Hemenway und Heitman, 1999). Als zellulärer Speicher für Calcium dient das endoplasmatische Reticulum. Calmodulin ist ein azides Protein, das vier „EF-hand“-Motive besitzt, die jeweils ein Calciumion binden können. Inhibitor-Studien weisen darauf hin, dass Ca^{2+} -Signale in die Steuerung einer Vielzahl zellulärer Prozesse involviert ist, wie z.B. Sekretion, Verzweigung und Elongation der Hyphen oder Sporulation (Gadd, 1994; Shaw und Hoch, 2000).

Eine Deletion des Gens der katalytischen Untereinheit von Calcineurin (*cnaA/calA*) in *A. fumigatus* wurde von Steinbach et al. und da Silva-Ferreira et al. charakterisiert (2006/2007). Die Mutanten weisen eine reduzierte apikale Hyphenextension auf, was mit einem erhöhten Grad der Verzweigung korreliert. Soriani et al. (2008) haben den Calcineurin-abhängigen Transkriptionsfaktor CrzA aus *A. fumigatus* untersucht und seine Verknüpfung mit der Proteinphosphatase Calcineurin beschrieben. Beide Deletionsmutanten (ΔcrzA und ΔcnaA) zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Hitze, wobei nur die ΔcrzA -Mutante sensitiv auf erhöhte extrazelluläre Calciumkonzentrationen reagierte. Die Virulenz aller bisher untersuchten Mutanten des Calcium-Signalwegs war in den jeweils verwendeten murinen Inhalations-/Infektionsmodellen stark attenuiert (Soriani et al., 2008; Cramer jr. et al., 2008; Steinbach et al., 2006; da Silva-Ferreira et al., 2007).

Sensierung von Stress

Das am besten studierte Beispiel für die Sensierung von Stress in Pilzen ist der Hog1p/MAP-Kinase-Weg aus *S. cerevisiae*, dessen zentrale Bestandteile bei allen Eukaryoten konserviert sind. In Hefe ist zur Aktivierung dieses Signalweges ein Zweikomponenten-Regulationssystem nötig, welches aus dem Histidinkinase-Sensor Sln1p, dem „phosphorelay protein“ Ypd1p und dem „response regulator“ Ssk1p besteht. Wenn die Zelle hyperosmotischem Stress ausgesetzt ist, wird der Phosphattransfer der Sensorkinase via Ypd1p auf den „response regulator“ unterbunden. Dephosphoryliertes Ssk1p überträgt das Signal auf die Hog1p-MAP-Kinase-Kaskade und steuert so z.B. die Osmoregulation durch Produktion von Glycerol (Posas und Saito, 1997; 1998).

In *A. fumigatus* wurde von Lessing et al. (2007) ein durch oxidativer Stress regulierter Transkriptionsfaktor, AfYap1, charakterisiert. In Analogie zur Bäckerhefe wird eine AfYap1-eGFP-Fusion durch oxidativen Stress in den Kern transportiert. Durch die Oxidation konservierter Cysteine und der Ausbildung von Disulfidbrücken wird das Kernexportsignal des Transkriptionsfaktors maskiert und AfYap1 akkumuliert im Nukleus. In *S. cerevisiae*, und vermutlich auch in *A. fumigatus*, wird mittels Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase Yap1p reduziert und das Exportsignal demaskiert. Yap1p wird aus dem Kern exportiert und die Transkription von Genen zur Stressantwort durch Yap1p beendet (Izawa et al., 1999).

Heterotrimere G-Proteine, cAMP und Proteinkinase A

Eine weitere bei Eukaryoten hochkonservierte Signalkaskade ist der cAMP-PKA-Signalweg. Hierbei wird nach einem externen Stimulus das „second messenger“-Molekül cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) durch eine Adenylatzyklase gebildet. Das cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche je nach Interaktionspartner eine bestimmte zelluläre Antwort auslöst (Abb. 2).

In einer Vielzahl eukaryotischer Organismen, darunter auch pathogene Pilze, konnten die Bestandteile der cAMP-PKA-Signalkaskade bereits identifiziert werden. Die Kaskade besteht im Wesentlichen aus einem heterotrimeren G-Protein, einer Purinzyklase, der Proteinkinase A und Regulatoren, wie z.B. Phosphodiesterasen oder RGS („regulators of G protein signaling“)-Proteinen, die für eine Feinregulierung des Signals verantwortlich sind. In Tabelle 1 sind Komponenten der Signalkaskade der Modellorganismen *S. cerevisiae* und *A. nidulans* sowie *A. fumigatus* aufgelistet.

Tabelle 1: Komponenten der cAMP-PKA-Signalkaskade (Referenzen stellen die Arbeiten dar, in denen eine funktionale Charakterisierung durchgeführt wurde)

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. fumigatus</i>
G-Protein α Untereinheiten (UE)	GPA1, GPA2 (Xue et al., 1998; Yun et al. 1998)	FadA (Yu et al., 1999), GanA, GanB (Han et al., 2004)	GpaA, GpaB (Liebmann, 2003) GanA/GpaC
G-Protein β UE	STE4 (Whiteway et al., 1989)	SfaD (Rosen et al., 1999)	SfaD (AFUA_5G12210)
G-Protein γ UE	STE18 (Whiteway et al., 1989)	GpgA (Seo et al., 2004)	GpgA (AFUA_1G05210)
Adenylatzyklase (AC)	CYR1 (Matsumoto et al., 1984)	CyaA (Fillinger et al., 2002)	ACYA (Liebmann, 2003)
PKA, regulatorische UE (PKAR)	BCY1 (Toda et al., 1987a)	PkaR (AN4987)	PKAR (Liebmann 2003)
PKA, katalytische UE (PKAC)	TPK1, TPK2, TPK3 (Toda et al., 1987b)	PkaA (Shimizu und Keller, 2001); PkaB (Ni et al., 2005)	PKAC1, PKAC2 (Liebmann 2003)
Phosphodiesterase, niedrig-affin	PDE1 (Nikawa et al., 1987)	PDEA (AN0829)	PDEA (AFUA_1G14890)
Phosphodiesterase, hoch-affin	PDE2 (Sass et al., 1986)	PDEB (AN2740)	PDEB (AFUA_1G12760)
„Regulator of G protein Signalling“- (RGS) Proteine	SST2 (Dohlman et al., 1996), RGS2 (de Versele et al., 1999), MDM1 (Chasse et al., 2006), RAX1 (Fujita et al., 2004)	FlbA (Hicks et al., 1997), RgsA/RgsB/RgsC (Han et al., 2004)	FlbA (AFUA_2G11180), RgsA (AFUA_6G06860), Rax1 (AFUA_4G12640), RgsB (AFUA_5G00900), Mdm1 (AFUA_1G09040)
Carbo-Anhydrase	NCE103 (Götz et al., 1999)	AN5611	Nce103

Im Ruhezustand bindet der heterotrimere G-Protein-Komplex, der sich aus einer α -Untereinheit und einem $\beta\gamma$ -Heterodimer zusammensetzt, an einen transmembranen Rezeptor. In dieser Form bindet die α -Untereinheit ein Guanosindiphosphat (GDP). Wird durch einen externen Stimulus der Rezeptor aktiviert, führt dies zu einer Konformationsänderung, die die Affinität der α -Untereinheit zu Guanosintriphosphat (GTP) erhöht. Ob der Rezeptor aber bereits vor Exposition mit einem Agonisten physischen Kontakt zum G-Protein hat, ist Gegenstand aktueller Forschung, wobei die Hinweise sich verdichten, dass eine basale Interaktion stattfindet (Nobles et al., 2005). Wenn das an dem heterotrimeren G-Protein gebundene GDP zu GTP ausgetauscht wird, hat das die Dissoziation des $G\alpha$ -Proteins vom $\beta\gamma$ -

Heterodimer zur Folge. Diese aktive, GTP-bindende Form der α -Untereinheit kann im Zytoplasma diffundieren und mit intrazellulären Zielproteinen interagieren. Um eine dauerhafte Aktivierung zu unterbinden, besitzen $G\alpha$ -Proteine eine intrinsische GTPase-Aktivität, die die Abspaltung von anorganischem Phosphat vom GTP katalysiert (Gilman, 1987). $G\alpha$ -Proteine wurden in Pilzen von Bölker (1998) anhand ihrer zellulären Funktion in Bezug auf die Adenylatzyklase (AC) und anhand ihrer Proteinsequenz klassifiziert. $G\alpha$ -Protein Untereinheiten der Gruppe I stimulieren, die der Gruppe III inhibieren die cAMP-Synthese der AC. Proteine der Gruppe II haben keinen Einfluss auf die Aktivität der AC.

Purinnukleotidzyklasen, zu denen auch die AC gehört, sind anhand ihrer Proteinsequenz in sechs Gruppen unterteilt. Gruppe III („universal class“) besteht sowohl aus Adenylat- als auch aus Guanylatzyklasen und beinhaltet pro- und eukaryotische Vertreter. Im Reich der Pilze ist die Struktur der Adenylatzyklasen konserviert, so dass je eine C-terminale Zyklase-, eine Serin/Threonin-Proteinphosphatase-, eine Leucinezipper- und eine N-terminale Ras-Interaktionsdomäne vorhanden ist (Baker und Kelly, 2004). Die zelluläre Lokalisation kann entweder zytosolisch oder Membran-gebunden sein, wobei dazu zumindest eine transmembrane Domäne in der Proteinsequenz vorhanden sein muss. Die Adenylatzyklase aus *A. fumigatus* besitzt keine transmembrane Domäne, so dass vermutlich eine zytosolische Lokalisation vorliegt.

Eine weitere Möglichkeit der Regulation der Adenylatzyklase besteht durch Carboanhydrasen: Kohlendioxid gelangt vermutlich durch einfache Diffusion ins Zytoplasma und wird von Carboanhydrasen mit Wasser zu Hydrogencarbonat-Anionen umgesetzt. Diese werden entweder für anabole Stoffwechselreaktionen benötigt oder haben einen direkten, aktivierenden Einfluss auf die Aktivität der AC (Bahn und Mühlshlegel, 2006). So konnten Klengel et al. (2005) die Aktivierung der Adenylatzyklase (CDC35) aus *C. albicans* durch physiologische Konzentrationen (5% v/v) von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ nachweisen. Auch in dem Basidiomyceten *C. neoformans* konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Carboanhydrasen, Adenylatzyklase und der Produktion von Kapselpolysaccharid belegt werden (Mogensen et al., 2006).

Die nächsttiefere Ebene der Signalkaskade stellt die Proteinkinase A dar. Das inaktive Holoenzym liegt als Tetramer vor, bestehend aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten. In Abwesenheit von cAMP ist die Phosphotransferase-Aktivität durch Bindung der Untereinheiten unterbunden. Steigt der intrazelluläre Spiegel des „second

“messenger“, binden cAMP-Moleküle an die regulatorischen Untereinheiten der PKA, wodurch die katalytischen Untereinheiten freigesetzt werden. In *S. cerevisiae* existieren drei katalytische Untereinheiten, Tpk1p-Tpk3p (Toda et al., 1987b), wohingegen bei vielen filamentösen Ascomyzeten, z.B. *Neurospora crassa*, *A. nidulans*, *A. oryzae* und *A. fumigatus* nur zwei Gene für katalytische Untereinheiten gefunden wurden (Borkovich et al. 2004; Shimizu und Keller, 2001; Ni et al., 2005; Liebmann, 2003). Die pathogenen Basidiomyceten *C. neoformans* var. *grubii* (Serotyp A) und *Ustilago maydis* besitzen ebenfalls je zwei Untereinheiten (Hicks et al., 2004; Dürrenberger et al. 1998), die aber in ihrer Funktion teilweise additiv sind.

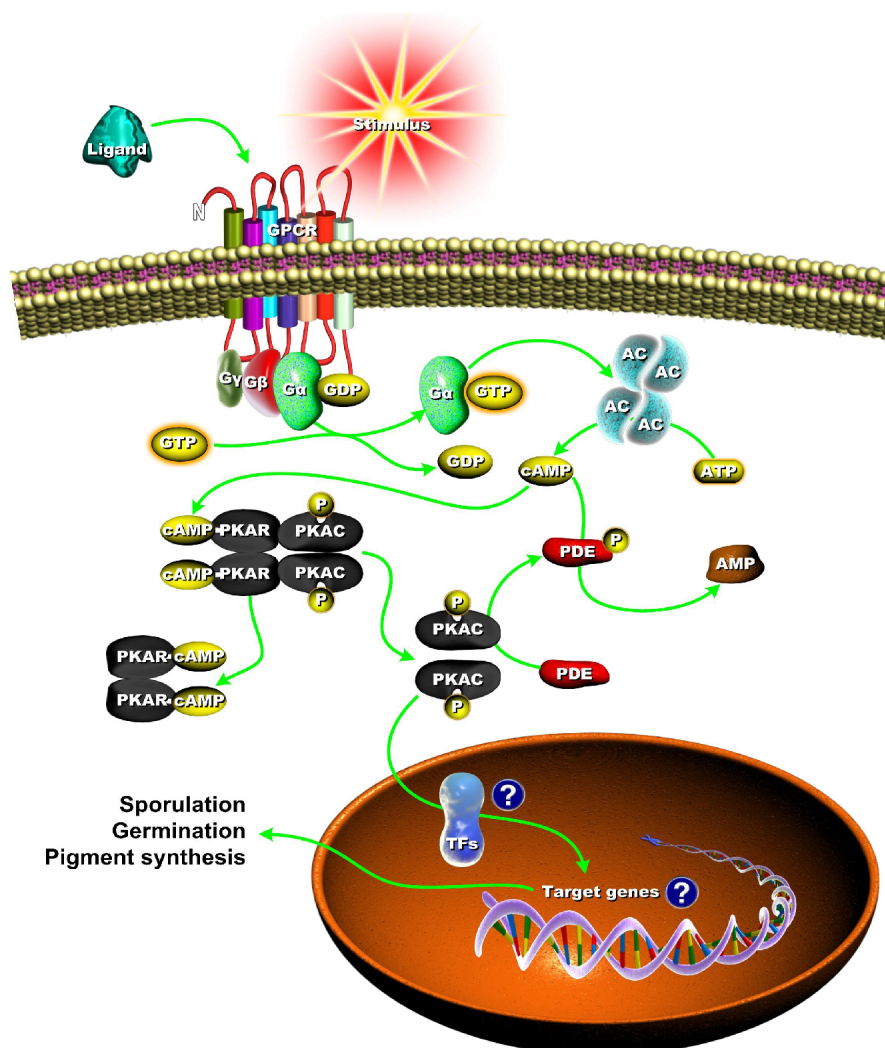


Abbildung 2: Übersicht über konservierte Elemente des Proteinkinase A-Signalweges und Zusammenfassung der über die PKA regulierten zellulären Prozesse in *A. fumigatus* (GPCR=G Protein-gekoppelter Rezeptor; G $\alpha/\beta/\gamma$ = GProtein Untereinheiten; AC=Adenylatzyklase; cAMP zyklisches Adenosinmonophosphat; ATP=Adenosintri-phosphat; PDE=Phosphodiesterase; PKAC/R=katalytische/regulatorische Proteinkinase A-UE; P=anorganisches Phosphat; GDP/GTP= Guanosin-di/tri-phosphat; TF=Transkriptionsfaktor)

In *A. nidulans* war die Proteinkinase A Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Ni et al. (2005) stellten Deletionen beider katalytischer Proteinkinase A-Untereinheiten her (PkaA, PkaB). Durch Kreuzung der Einzelmутanten konnten keine Doppelmutanten mit gewünschtem Genotyp erzeugt werden. Außerdem konnte der Phänotyp einer Deletion des *pkaA*-Gens nicht vollständig mithilfe einer Überexpression von *pkaB* supprimiert werden. Deshalb spekulieren Ni et al. (2005) über überlagernde Funktionen der beiden katalytischen Untereinheiten. Gegensätzliche Funktionen scheinen die beiden Proteinkinase-Untereinheiten in der Regulation der Antwort auf oxidativen Stress zu vermitteln, da die Überproduktion von *pkaB* oder die Deletion von *pkaA* zu einer erhöhten Sensitivität der Hyphen gegenüber Wasserstoffperoxid führt.

In *A. fumigatus* zeichnet das PKA-Netzwerk für eine Vielzahl essentieller physiologischer Prozesse verantwortlich, was sich in drastischen Phänotypen widerspiegelt, die durch einen Eingriff in die Regulation der PKA-Aktivität hervorgerufen werden (Liebmann et al., 2004; Zhao et al., 2006; Grosse et al., 2008). Sowohl die Deletion als auch die Überproduktion der katalytischen Untereinheit der PKA führt zur Beeinträchtigung der Sporulation, der Pigmentbiosynthese und zu beeinträchtigtem Wachstum.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Eine der größten Proteinfamilien, für die das menschliche Genom kodiert, sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Mit einer geschätzten Zahl von mehr als 800 Vertretern (Frederiksson et al., 2003) dienen die Rezeptoren der Erkennung vielfältiger Stimuli wie z.B. Photonen/Licht, Hormone, Lipide, Nukleotide, etc.. Weitere Vertreter dieser selbst in Archaea und Pflanzen nachgewiesenen Proteinfamilie sind Rhodopsine, Pheromonrezeptoren oder cAMP-Rezeptoren, die wie Letztere z.B. in *Dictyostelium discoideum* das äußerst komplexe Sozialverhalten bedingen.

Hall et al. (1999) heben schon im Titel ihres Übersichtsartikels „Heptahelical Receptor Signaling: Beyond the G Protein Paradigm“, zwei wichtige Tatsachen hervor: zum einen haben GPCRs die sieben transmembranen Helices gemein und zum anderen sind diese Rezeptoren aber nicht zwangsläufig mit heterotrimeren G-Proteinen als intrazellulärem Interaktionspartner in Verbindung zu setzen. Immense Bedeutung haben GPCRs für den pharmakologischen Einsatz, da durch den gezielten Gebrauch von Liganden Rezeptoren stimuliert oder blockiert werden können. Hierdurch lassen sich sehr präzise Abläufe im Organismus beeinflussen, was durch die Tatsache gestützt wird, dass mehr als 40% aller

erhältlichen Medikamente GPCRs als Ziel haben (Filmoré, 2004).

Obgleich heptahelikale Rezeptoren eine große Bedeutung für den Menschen haben, sind bis dato nur wenige GPCRs in Pilzen identifiziert worden. Hierzu gehörten u.a. Pheromon- und Glucoserezeptoren in *S. cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*.

Ein Zusammenhang zwischen Glucose-Stimulus und dem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels wurde von Thevelein bereits 1994 in der Hefe nachgewiesen. Auch die Abhängigkeit der zellulären Antwort auf Glucose von dem G α -Protein Gpa2p war bekannt (Colombo et al., 1998). Das fehlende Glied in der Kette wurde von Kraakman et al. (1999) in Form eines sieben transmembranspannenden Rezeptors entdeckt. In Abhängigkeit des Rezeptors reguliert diese Signalkaskade weitere cAMP-PKA-kontrollierte Eigenschaften, wie z.B. Trehalose- und Glykogenlevel oder die Fähigkeit Hungerperioden zu überstehen.

Eine weitere gut untersuchte Signalkaskade reguliert die Paarung von *S. cerevisiae*. Die Pheromonrezeptoren Ste2p und Ste3p interagieren mit der zweiten G α -Protein-Untereinheit, Gpa1p, welche mit Ste4p (β -UE) und Ste18p (γ -UE) ein vollständiges, heterotrimeres G-Protein bildet. Das $\beta\gamma$ -Heterodimer ist wiederum verantwortlich für die Aktivierung einer MAP-Kinase (Fus3p), welche einen Zellzyklusarrest induziert und die Paarung einleitet (Versele et al., 2001).

Die zunehmende Verfügbarkeit sequenzierter Pilzgenome führte zu der Identifizierung von weiteren putativen GPCRs in *N. crassa* (Galagan et al., 2003) und der ersten Charakterisierung einer GPCR-Deletionsmutante in *A. nidulans*: Han et al. (2004) konnten per Sequenzvergleich neun putative G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, GprA – GprI, identifizieren/bestimmen. In der Arbeit wurden mehrere Genloci disruptiert und eine der Disruptionsmutanten, GprD, charakterisiert. Der Rezeptor scheint als negativer Regulator der sexuellen Entwicklung zu agieren, lässt sich aber mit keinem Phänotyp einer G α -Protein-Mutante direkt in Verbindung bringen.

Die Arbeit von Kulkarni et al. (2005) gab einen ersten Hinweis darauf, dass auch bei Pilzen die Gruppe der heptahelikalen Rezeptoren größer ist, als es bisher vermutet wurde. Die *in silico*-Analyse des sequenzierten Genoms des Pflanzenpathogens *Magnaporthe grisea* offenbarte eine Vielzahl von GPCR-Kandidaten. Hierzu gehören Pheromonrezeptoren (2), cAMP-Rezeptor-ähnliche (6), Gpr1p-ähnliche (1), *S. pombe* Stm1p-ähnliche (2), Steroid/mPR-ähnliche (3), MG00532.4 (1) und PTH11-ähnliche Rezeptoren (61), so dass insgesamt mehr als 75 Proteine identifiziert wurden, die die typischen Charakteristika, d.h.

einen extrazellulären Amino-, einen intrazellulären Carboxy-Terminus und sieben transmembrane Domänen, aufweisen. Die PTH11-ähnlichen Rezeptoren verdanken ihren Namen dem ersten beschriebenen Vertreter der Gruppe, der von de Zwaan et al. (1999) nur als membranständiges Protein, nicht aber als GPCR charakterisiert wurde. Pth11p wurde als essentiell für die Appressorienbildung und damit der Virulenz des Pflanzenpathogens beschrieben. Das Appressorium ist die infektiöse Struktur von *M. grisea*, die mittels eines Turgordrucks von 80 bar die harte Cuticula des Pflanzenwirts durchbricht und zur Infektion notwendig ist (Howard et al., 1991).

Ziele der Arbeit

Die Konservierung zahlreicher Signalkaskaden in filamentösen Pilzen und Hefen ist unbestritten. Die immer gleichen zentralen Komponenten kontrollieren die Entwicklung, Morphogenese oder auch Virulenz. Die Aktivierung oder auch Regulation der einzelnen Signalkaskaden auf spezifische Stimuli spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Der von Liebmann et al. (2004) in *Aspergillus fumigatus* beschriebene cAMP-PKA-Signalweg stellt einen äußerst interessanten Ansatzpunkt für die Aufklärung für dessen Rolle bei der Virulenz dar. Die charakterisierte G α -Protein-Untereinheit GpaB weist keinen starken Wachstumsdefekt auf, ist in einem murinen Infektionsmodell aber deutlich weniger virulent als ein vergleichbarer Wildtyp. Es ist also von Interesse zu klären, welche Signale und Rezeptoren die Kaskade aktivieren, dessen Element GpaB ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten putative G-Protein-gekoppelte Rezeptoren von *A. fumigatus* identifiziert und charakterisiert werden. Weiterhin sollte die mögliche Interaktion mit der cAMP-Signaltransduktionskaskade und weiteren „downstream“-Effektoren, die durch diese heptahelikalen, transmembranen Rezeptoren reguliert werden, untersucht werden. Hierzu sollten auch zwei weitere G α -Protein-Untereinheiten charakterisiert werden.

Die mögliche Identifizierung eines spezifischen Liganden, der den Prozess der Infektion bedingt, wäre auch aus therapeutischer Sicht interessant. Durch die Verabreichung eines spezifischen Liganden oder Antagonisten könnte der Rezeptor blockiert und eine mögliche Infektion verlangsamt oder gestoppt werden.

B. Material und Methoden

Mikrobiologische Methoden

Bakterienstämme, Pilzstämme und Plasmide

In Tabelle 1 sind Genotyp und Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Stämme aufgelistet.

In Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit benutzten und konstruierten Plasmide aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Bakterien- und Pilzstämme

Stamm	Genotyp und/oder Phänotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
Alpha Select	<i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- m_k^+), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , Δ (<i>lacZYA-argFV169</i>), $\Phi 80 \delta$ <i>lacZ</i> Δ M15 F-	Bioline; Luckenwalde
<i>Aspergillus fumigatus</i>		
ATCC 46645	Wildtyp	American Type Culture Collection; Manassas, USA
CBS144.89 (DAL)	Wildtyp	Central Bureau for Schimmel Cultures; Delft, Niederlande
CEA17 Δ <i>akuB</i> ^{KU80} <i>pyrG</i>	Δ <i>akuB</i> , <i>pyrG1</i>	da Silva-Ferreira et al., 2006
CEA17 Δ <i>akuB</i> ^{KU80}	Δ <i>akuB</i>	da Silva-Ferreira et al., 2006
CEA17	DAL; <i>pyrG1</i>	d'Enfert et al., 1996
Δ GprB	<i>pyrG1</i> ; <i>gprB::</i> (<i>neo-A.n.pyrG-neo</i>); Δ <i>gprB</i>	Diese Arbeit
Δ GprC	Δ <i>akuB</i> ; <i>pyrG1</i> ; <i>gprC::</i> (<i>A.n.pyrG</i>); Δ <i>gprC</i>	Diese Arbeit
Δ GprChph	Δ <i>akuB</i> ; <i>gprC::hph</i> ; Δ <i>gprC</i>	Diese Arbeit
Δ GprC17.8	<i>pyrG1</i> ; <i>gprC::</i> (<i>A.n.pyrG</i>); Δ <i>gprC</i>	Diese Arbeit
Δ GprD	Δ <i>akuB</i> ; <i>pyrG1</i> ; <i>gprD::</i> (<i>A.n.pyrG</i>); Δ <i>gprD</i>	Diese Arbeit
Δ GpaA	Δ <i>akuB</i> ; <i>pyrG1</i> ; <i>gpaA::ptrA</i> ; Δ <i>gpaA</i>	Diese Arbeit
Δ GpaC	Δ <i>akuB</i> ; <i>pyrG1</i> ; <i>gpaC::ptrA</i> ; Δ <i>gpaC</i>	Diese Arbeit
Δ GprO	Δ <i>akuB</i> ; <i>pyrG1</i> ; <i>gprO::ptrA</i> ; Δ <i>gprO</i>	Diese Arbeit
Δ GprP	Δ <i>akuB</i> ; <i>pyrG1</i> ; <i>gprP::ptrA</i> ; Δ <i>gprP</i>	Diese Arbeit
Δ GprG	Δ <i>akuB</i> ; <i>pyrG1</i> ; <i>gprG::</i> (<i>A.n.pyrG</i>); Δ <i>gprG</i>	Diese Arbeit
nat_GprC_eGFP	ATCC; <i>gprC-eGFP</i> , Hyg ^R , nativer Promoter	Diese Arbeit
otef_GprC_eGFP	ATCC; <i>otefP::gprC-eGFP</i> , Hyg ^R	Diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete Plasmide

Stamm	Genotyp und/oder Phänotyp	Referenz
pCR2.1	<i>lacZ</i> , Amp ^R , Kan ^R	Invitrogen, Karlsruhe
pJET/blunt	Amp ^R , pUC19-Derivat mit MCS in <i>eco47IR</i>	Fermentas; St.Leon-Rot
pUC18	Amp ^R	Yanisch-Perron et al., 1985
p123	Amp ^R ; <i>otefP::eGFP::nosT</i>	Spellig et al., 1996
p123_hph	p123; enthält Hygromycinresistenzkassette	Diese Arbeit
pUC_hph	pUC18; enthält <i>hph</i> -Kassette mit <i>NotI</i> Schnittstellen	Schöbel (pers. Mitteilung)
pUC_Δ gprC	pUC18; <i>gprC</i> -Deletionsvektor, <i>A.n. pyrG</i>	Diese Arbeit
pUC_Δ gprD	pUC18; <i>gprD</i> -Deletionsvektor; <i>A.n. pyrG</i>	Diese Arbeit
pUC_Δ gpaA	pUC18; <i>gpaA</i> -Deletionsvektor; <i>A. o. ptrA</i>	Diese Arbeit
pUC_Δ gpaC	pUC18; <i>gpaC</i> -Deletionsvektor; <i>A. o. ptrA</i>	Diese Arbeit
pUC_Δ gprO	pUC18; <i>gprO</i> -Deletionsvektor; Hyg ^R	Diese Arbeit
pUC_Δ gprP	pUC18; <i>gprP</i> -Deletionsvektor; Hyg ^R	Diese Arbeit
pUC_Δ gprF	pUC18; <i>gprF</i> -Deletionsvektor; Hyg ^R	Diese Arbeit
pUC_Δ gprG	pUC18; <i>gprG</i> -Deletionsvektor; Hyg ^R	Diese Arbeit
pUC_Δ gprB	pUC18; <i>gprB</i> -Deletionsvektor; (<i>neo-A.n.pyrG-neo</i>)	Diese Arbeit
p123_natGprC	p123_hph; GprC-eGFP, nativer Promoter	Diese Arbeit
p123_GprC_hph	p123_hph; GprC-eGFP, konstitutiver Promoter	Diese Arbeit

Nährmedien

Die nachfolgenden Medien (Tabelle 3) wurden zur Kultivierung der Organismen verwendet. Mögliche Medienzusätze sind am Ende der Tabelle 3 gelistet. Prozentangaben sind, soweit nicht anders angegeben, w/v-Angaben.

Tabelle 4: Nährmedien

Medium	Zusammensetzung
Luria-Bertoni (LB)-Medium	Trypton 10 g/L Hefeextrakt 5 g/L NaCl 10 g/L
<i>Aspergillus</i>-Minimalmedium (AMM)	NaCO ₃ 6 g/L K ₂ HPO ₄ 1,52 g/L KCl 0,52 g/L Glucose 10 g/L MgSO ₄ *7H ₂ O 0,5 g/L Hutners Spurenelemente 1 mL/L pH-Wert 6,3 – 6,5 (10N KOH)
HUTNER'S Spurenelemente (100mL)	2,2g ZnSO ₄ *7H ₂ O; 1,1g H ₃ BO ₃ ; 0,5g MnCl ₂ *4H ₂ O; 0,5g FeSO ₄ *7H ₂ O; 0,16g CoCl ₂ *6H ₂ O; 0,16g CuSO ₄ *5H ₂ O; 0,11g (NH ₄) Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O; 5g EDTA

Sabouraud-Medium	Mycopeptone	10 g/L
	Glucose	20 g/L
AMM Transformations-Medium	AMM mit osmotischem Stabilisator:	
	KCl oder	0,6 M
	Sorbitol	1,2 M
Malzextraktmedium	Malzextrakt	20 g/L
	Hefeextrakt	2 g/L
	Glucose	10 g/L
	NH ₄ Cl	0,25 g/L
	K ₂ HPO ₄	0,25 g/L
YEPD-Medium	Hefeextrakt	20 g/L
	Pepton	1 g/L
	Glucose	20 g/L
Medienzusätze		
für Agarplatten	Select – Agar (Invitrogen, Karlsruhe)	20 g/L
LB-Medium	X-Gal	40 µg/mL
	IPTG	1mM
	Ampicillin	100 µg/mL
	Kanamycin	50 µg/mL
AMM-Medium	Hygromycin B	60 – 240 µg/mL
	Pyrithiamin	0,1 µg/mL
	Uracil	440 µg/mL

Kulturbedingungen

Escherichia coli

Reagenzgläser mit 3-5 mL supplementiertem LB-Medium wurden mit *E. coli*-Einzelkolonien inokuliert und bei 37 °C für 14-18 h und 200 U/min inkubiert.

Aspergillus fumigatus

A. fumigatus Kulturen wurden in 250 resp. 500 mL Erlenmeyerkolben mit 50-100mL supplementiertem Medium und standardmäßig mit $1 \cdot 10^6$ Sporen/mL angeimpft und wenn nicht anders angegeben bei 37 °C und 200 U/min inkubiert.

Für die Gewinnung von chromosomaler DNA, RNA oder Proteinrohextrakten aus *A. fumigatus*-Mycel wurde AMM in einem Erlenmeyerkolben mit $1 \cdot 10^6$ bis $5 \cdot 10^6$ Konidien/mL angeimpft und für 16-30 Stunden bei 37 °C mit 200 U/min inkubiert. Die Ernte des Mycels zur Isolierung von Nukleinsäuren oder Proteinen erfolgte über Filtergaze (MiraCloth, Calbiochem). Nach kurzem Trockenpressen mit Papiertüchern wurde das Mycel in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Aufschluss erfolgte via Mörser und Pistill oder in einem Zellhomogenisator (FastPrep, Q-Biogen) mit „Lysing Matrix A“-Reaktionsgefäßen.

Herstellung von Sporensuspensionen

Um Sporen von *A. fumigatus* zu gewinnen, wurden AMM/Malz-Agarplatten mit den jeweiligen stammspezifischen Supplementen mit Konidien angeimpft und für mindestens 2-3 Tage bei 37 °C inkubiert. Reife Sporen wurden mit 10mL sterilem Wasser oder mit steriler 0,9% NaCl / 0,1% (v/v) Tween20-Lösung überschichtet und mit Hilfe einer Impföse vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde über einen „Cell Strainer“ (40µm, Nylon, BD Bioscience) gefiltert und bei 4 °C aufbewahrt. Der Sporentiter wurde mittels THOMA-Zählkammer oder einem Partikelmeßgerät (Modell CASY TT Innovatis, Bielefeld) bestimmt.

Bestimmung spezifischer Wachstumsraten

Um die spezifische Wachstumsrate auf festen Medien zu bestimmen, wurden jeweils 5 µl einer Sporensuspension mit jeweils spezifizierter Sporenmenge auf eine Agarplatte getropft und bei Raumtemperatur, 37 °C oder 48 °C für 72-120 Stunden inkubiert. Einmal pro Tag wurde der Durchmesser jeder Kolonie (drei Parallelansätze) gemessen.

Sporenquantifizierung

50µl einer Sporensuspension mit $2 \cdot 10^6$ Konidien/mL wurden auf AMM-Agarplatten ausplattiert. Von jedem Stamm wurden 5 Platten für mindestens drei Tage bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 10mL sterilem Wasser geerntet. Die Sporensuspensionen wurden über einen „Cell Strainer“ (40µm, Nylon, BD Bioscience) filtriert und in einem Partikelmeßgerät ausgezählt.

Auskeimungsrate

Zur Untersuchung des Auskeimungsverhaltens der einzelnen Stämme wurden jeweils $2 \cdot 10^7$ Konidien/mL in 15mL Sabouraudmedium in einer Petrischale mit Deckgläschen bei 37 °C inkubiert. Stündlich wurde jeweils ein Deckglas mit adhärierenden Konidien entnommen und unter dem Mikroskop in Bezug auf das Auskeimungsverhalten untersucht. Die Sporen galten als ausgekeimt, wenn die Spore einen sichtbaren Keimschlauchansatz hatte. Pro Zeitpunkt und Stamm wurden mindestens 100 Sporen ausgezählt. Der Versuch wurde sowohl mittels Lichtmikroskopie, als auch mit FITC-markierten Sporen an einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.

Sensitivität gegenüber reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Die Untersuchung der Reaktion von *A. fumigatus*-Sporen auf ROS wurde auf Festmedium

durchgeführt. Dazu wurden AMM-Agarplatten mit 15mL AMM als Unterschicht gegossen und 15mL Oberschichtagar mit $1 \cdot 10^8$ Sporen versetzt und auf die Unterschicht gegeben. Nach Erstarren des Agars wurde ein Loch von 10mm Durchmesser in die Agarschicht gestanzt und dieses mit 150µl der zu testenden Substanz (3% Wasserstoffperoxid, 8mM Menadion oder 0,2M Diamid). Die Bestimmung des Hemmhofdurchmessers erfolgte nach Übernacht-Inkubation bei 37 °C.

Molekularbiologische Methoden

Isolierung von Nukleinsäuren

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte über das „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit“ der Firma Peqlab anhand des zugehörigen Protokolls. Das Funktionsprinzip beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse und Anionenaustausch-Chromatographie.

Isolierung chromosomaler DNA aus *A. fumigatus*

Die chromosomale DNA aus *A. fumigatus* wurde nach einer abgewandelten Methode der DNA-Präparation aus Hefe von Hoffman und Winston (1987) präpariert. Eine *A. fumigatus*-Kultur wurde über Nacht bei 37 °C angezogen, geerntet und aufgeschlossen. Ein 2 mL-Reaktionsgefäß wurde mit etwa 150µg Mycel gefüllt und mit 40µl TE-Puffer angefeuchtet. Es wurden 200µl Aufschlusspuffer, 200µl Phenol/Chloroform und 0,3µg Glaskügelchen (Ø 0,5mm) vor dem Vortexen zugegeben. Nach Zugabe von weiteren 400µl TE-Puffer folgte eine 5-minütige Zentrifugation, nach der die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Diese wurde im Anschluss mit 1mL 96% (v/v)-igem Ethanol versetzt, gemischt und erneut für zwei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet angetrocknet und in 400µl TE-Puffer mit 20µg RNase A resuspendiert. Nach Inkubation für zehn Minuten bei 50 °C wurden 15µl 3M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und 1mL 96% (v/v)-iger Ethanol zugegeben, gemischt und für zwei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das restliche Ethanol durch Trocknen an der Luft oder in der SpeedVac entfernt. Das getrocknete Pellet wurde in 50µl TE-Puffer resuspendiert.

Isolierung von RNA aus *A. fumigatus*

Die Gesamt-RNA aus *A. fumigatus* wurde mit Hilfe von TRIsure (Bioline, Luckenwalde) nach den Herstellerangaben isoliert. Zur Isolierung wurden ~150µg Mycel in einem

„innuPREP Lysis A“-Gefäß (Analytik Jena) mit 1mL TRIsure versetzt und in einem Homogenisator mechanisch aufgeschlossen.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose

Nach der Auftrennung von DNA-Fragmenten über Gelelektrophorese mit 1%igen TAE-Agarosegelen wurden die gewünschten DNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) anhand des Herstellerprotokolls isoliert.

Methoden zur Modifikation von Nukleinsäuren

Enzymatische *in vitro* Reaktionen

Die Spaltung von DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Frankfurt a.M.; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) gemäß den Herstellerangaben. Die Spaltung wurde anschließend elektrophoretisch analysiert. Um Religationen des Plasmid-Vektors zu vermeiden, wurden an kompatiblen Enden die 5'-Phosphatgruppen des Vektors durch die „Calf Intestine Alkaline Phosphatase“ (Fermentas GmbH) entfernt. Ligationen kompatibler DNA-Fragmente wurden nach Herstellerangaben mit Hilfe der „T4 DNA Ligase (mit PEG)“ (Fermentas GmbH) bei Raumtemperatur für mindestens 15 Minuten durchgeführt. Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte in den pCR2.1 Vektor (Invitrogen) oder pJET/blunt (Fermentas) laut Herstellerangaben.

Amplifikation von DNA mittels PCR

Für die Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten, die Herstellung von „Southern blot“- und „Northern blot“-Sonden, der Selektion von positiven Klonen und für das Einführen von Mutationen, respektive Schnittstellen in DNA-Fragmente wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) angewendet. Für Standardreaktionen wurden die „BIOTAQ Red Polymerase“ (Bioline) oder der „GoTAQ Green Master Mix“ (Promega; Mannheim) eingesetzt. Für PCR-Produkte, die u.a. zur Klonierung von Fusionsproteinen eingesetzt werden sollten, wurden „proof-reading“ Polymerasen, wie die „Phusion High-Fidelity DNA Polymerase“ (Finnzymes) oder die VELOCITY DNA Polymerase (Bioline) benutzt. Als Matrize diente Plasmid-DNA, cDNA oder chromosomale DNA. Für die Kolonie-PCR von *E. coli*-Transformanten wurden einige Zellen mit Hilfe eines Zahnstochers in den Reaktionsansatz überführt.

Die Durchführung der PCR erfolgte in einem „T Gradient Cycler“ der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland). Das verwendete Programm zur Amplifikation richtete sich nach der eingesetzten Polymerase, den verwendeten Oligonukleotiden und der Matrize.

Oligonukleotide

Tabelle 5: Übersicht der relevanten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' > 3'	Schnittstelle	Locus / AfuA_
GprC_F	TCG GTC TTT CCCC CCT GCC ACA AC		7G04800
GprC_R	TGC ACG CCT GTT TGG GCT TT CG		
GprC_Not_F	CCG CTC TCG ACG GTT CCT GG TG	$\frac{1}{2}$ NotI	
GprC_Not_R	CCG CAT GTG GGG TCG GTA GTA C	$\frac{1}{2}$ NotI	
GprD_F	GAC TTG AGA GAT CAT CTC TGC		2G12640
GprD_R	CAC GGT CAG GGT AAG TTA TCC		
GprD_Not_F	CCG CAA GCC CAA TCG ACT TAG TCG	$\frac{1}{2}$ NotI	
GprD_Not_R	CCG CTT CCT GAG AAC GAG AGG	$\frac{1}{2}$ NotI	
GprC_Ba_F	GGA TCC GTC GAG AGC AAT GAG TCT TTT CC	BamHI	
GprC_Ba_R	GGA TCC CCA CAT CCG GGA TGC ATT GTC	BamHI	
Hsf_F	CAC AGT CTC GAA GCC ATA GC		5G01900
Hsf_R	CCA GCA CCG TCA TAC CCA TTG		
AspF3_F	TGA CAG CTT CCC CTC TGA CG		6G02280
AspF3_R	GTG CTT GAG GAC GGT CTC G		
Pnr1_F	CTG GAG CTG GTC AAG GC		5G09910
Pnr1_R	GGC AGG GAT GTT CCA GG		
Cat2_F	CGA TCT CCT GAT CCT CAC C		8G01670
Cat2_R	CCA GGA CGA TGA GAT CAG C		
Yap1_F	CAT GGC GGA CTA CAA TAC TCT TTA TCA		6G09930
Yap1_R	TTA GAC GCG ACC CAT GAT GTC CTC		
Skn7_F	CAG AGC GAA CAG CAA GGA G		6G12522
Skn7_R	CAT AGC GAT GAT AGG AGT TCG		

Herstellung der Sonden für „Southern blot“ bzw. „Northern blot“

Die Markierung der Sonde erfolgte über PCR-Amplifizierung des Sondenfragments und einem speziellen Desoxyribonukleotidmix mit Digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics

GmbH, Mannheim). Der verwendete Mix beinhaltet dTTP und DIG-11-dUTP in einem Verhältnis von 3:1.

Elektrophorese von Nukleinsäuren

Elektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1%igen horizontalen Agarosegelen mit 1xTAE als Laufpuffer (Sambrook et al., 1989). Zum Sichtbarmachen der DNA im UV-Licht wurden die Agarosegele mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid versetzt. Vor dem Auftragen wurde 1/6 des Probenvolumens an Auftragspuffer (5x „Loading Buffer“, Bioline) zu den Proben gegeben. Die Größenbestimmung der DNA erfolgt mittels eines Größenmarkers der Firma Bioline (HyperLadder I). Die Detektion der DNA-Banden erfolgte über eine Dokumentationsanlage der Firma AlphaInnotech (Biozym; Typ: AlphaImager).

Denaturierende Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA

Einzelsträngige RNA-Moleküle bilden Sekundärstrukturen durch intra- und intermolekulare Basenpaarungen aus. Dies hat ein verändertes Laufverhalten in Agarosegelen zur Folge, so dass RNA-Moleküle nicht aufgrund ihrer Größe aufgetrennt werden. Um eine reproduzierbare Auftrennung zu ermöglichen, die abhängig von der Größe des RNA-Fragmentes ist, müssen die Wasserstoffbrücken der Basenpaarung aufgehoben werden. Aus diesem Grund erfolgt die Auftrennung in einem denaturierenden Formaldehyd -Agarosegel.

Für das 1,2%ige RNA-Gel wurde die Agarose in 60mL Wasser und 16mL 5xRP-Puffer (200mM MOPS, 50mM Natriumacetat, 10mM EDTA, pH 7.0) aufgeköcht. Nach einer kurzen Abkühlungsphase wurden 4mL 37%(v/v)-iges Formaldehyd zugegeben. Als Laufpuffer diente 1xRP-Puffer. Aufgetragen wurden standardmäßig 10µg RNA. Die Proben wurden mit 10µl Probenpuffer (5mL Formamid, 1,4mL 37%(v/v) Formaldehyd, 4mL 5xRP, 0,8mL Auftragspuffer, 0,8mL 50% Glycerin, 15µl Ethidiumbromid) versehen.

Das Denaturieren der Proben erfolgte für 10 Minuten bei 65 °C. Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem horizontalen Gel bei einer Spannung von 90 V.

Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäurelösungen

Die Bestimmung der Konzentration von DNA- oder RNA-Proben erfolgte über ein Spektralphotometer (NanoDrop; Typ: ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer).

Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli* Alpha Select-Zellen (Bioline) wurden nach der RuCl-Methode mit Plasmid-DNA oder Ligationsansätzen transformiert (Sambrook et al., 1989).

Transformation von *A. fumigatus*

Die Herstellung rekombinanter *A. fumigatus* Stämme erfolgte durch Transformation von Protoplasten mit zirkulärer oder linearer DNA (modifiziert nach Ballance und Turner, 1985). Mycel von Übernachtskulturen wurde über Filtergaze filtriert, mit sterilem Wasser gewaschen und kurz getrocknet. Eine Spatelspitze Mycel wurde in einen 250mL Erlenmeyerkolben überführt und in 20mL 0,6M KCl / 400mg Glucanex (Novo Nordisk über Glösman Rohstoffe) / 10mM Phosphatpuffer pH 5,8 resuspendiert. Anschließend erfolgte eine ein- bis zweistündige Inkubation bei 30 °C unter leichtem Schwenken. Nach der Protoplastierung des Mycels wurden die Protoplasten zur Trennung vom restlichen Mycel über Filtergaze in Zentrifugenröhrchen filtriert und 10 min bei 4000 U/min pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in 10mL 0,6M KCl / 50mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und die Suspension erneut zentrifugiert. Nach Wiederholung dieses Waschvorganges wurde die Zellkonzentration bestimmt und das Pellet in 50µl 0,6M KCl / 50mM CaCl₂-Lösung aufgenommen, so daß etwa $5 \cdot 10^7$ Protoplasten enthalten waren. Diese wurden mit 1-5µg DNA sowie 15µl PEG-Lösung (25% PEG 8000; 50mM CaCl₂; 10mM Tris/HCl; pH 7,5) vorsichtig vermischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5mL PEG-Lösung und 5-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 1mL 0,6M KCl/50mM CaCl₂-Lösung. Anschließend wurde der Ansatz auf AMM-Topagar (0,6M KCl), welcher in Reagenzgläsern bei 55 °C vorinkubiert worden war, verteilt. Nach kurzem Mischen erfolgte das Ausgießen der Ansätze auf AMM-Agarplatten (0,6M KCl). Die Platten wurden für 2-3 Tage bei 37 °C inkubiert. Von den erhaltenen Transformanten wurden Konidien für Verdünnungsausstriche auf Selektivmedium abgenommen.

Nukleinsäure-Hybridisierungen

„Southern blot“

Mit Restriktionsendonukleasen verdaute chromosomale DNA wurde elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt. Die Fragmente wurden nach der Methode von Southern (1975) denaturiert und durch einen Kapillarblot mit 20x SSC-Puffer (3M Natriumchlorid, 0,3M tri-Natriumcitrat, pH 7,0; Sambrook et al., 1989) auf eine Hybond N⁺-Nylonmembran

(GE Healthcare Bioscience, Freiburg) übertragen. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte durch UV-„cross linking“.

„Northern blot“

Die zu untersuchende RNA wird bei einer „Northern blot“-Analyse in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Kapillarblot mit 10x SSC-Puffer auf eine Nylonmembran übertragen. Falls nicht näher spezifiziert wurden pro Probe 10µg RNA geladen.

„Southern blot“ / „Northern blot“-Hybridisierung und Detektion

Für die Hybridisierung wurde eine mit Digoxigenin-11dUTP markierte, spezifische DNA-Sonde (800-1000bp) mittels PCR synthetisiert. Vor der Hybridisierung wurde die Sonde denaturiert. Die Nylonmembran wurde für 30 Minuten bei 65 °C mit 20mL „DIG Easy Hyb“ prähybridisiert und nach Zugabe von 10µl denaturierter Sonde über Nacht bei 65 °C hybridisiert. Die Membran wurde zweimal für fünf Minuten bei Raumtemperatur in Waschlösung 1 (2xSSC, 0,1% SDS) und anschließend zweimal zehn Minuten bei 65 °C in Waschlösung 2 (0,1xSSC, 0,1%SDS) gewaschen. Die Detektion fand unter Verwendung von DIG-spezifischen, alkalische Phosphatase-gekoppelten Antikörpern und der Detektionslösung „CDP-Star, ready-to-use“ nach den Angaben des Herstellers statt. Um die Chemielumineszenz zu detektieren, wurde in einer Filmkassette ein Röntgenfilm (Kodak; Typ: X-Omat ARFilm, XAR-5) auf der Membran belichtet und anschließend entwickelt (AGFA, CURIX 60).

Alle Reagentien für die Hybridisierung und Detektion wurden von Roche Diagnostics GmbH bezogen und alle Puffer frisch nach Herstellerprotokoll angesetzt.

Transkriptomanalyse

Zur globalen Analyse der Expression und zur Aufklärung der durch Mutationen verursachten Effekte wurden Transkriptomanalysen durchgeführt. Diese wurden als Auftragsarbeit bei der Firma Febit (Heidelberg) durchgeführt. Zusätzlich wurden aus einer Kooperation (europäisches Aspergillus Konsortium) stammende Arrays benutzt.

Die Arrays sind auf Corning UltraGAPS-Slides gespottet, tragen pro Transkript eine doppelt gespottete 70-mer Sonde und repräsentieren inklusive Kontrollen über 10.000 Features. Zusätzlich ist der gesamte Array in Duplikat gespottet, so dass pro Transkript vier Datenpunkte zur Auswertung zur Verfügung stehen.

Zur Isolation der RNA wurde der „MasterPure Yeast RNA Purification“-Kit

(Epicentre/Biozym, Hessisch Oldendorf) verwendet. In Abwandlung zum Herstellerprotokoll wurden 150mg über Filtergaze geerntetes Mycel mit 600µL Lysispuffer in einem „innuPREP Lysis Tube A“ versetzt, mechanisch aufgeschlossen und im Anschluss für 15 Minuten im Wasserbad bei 70 °C inkubiert. Des weiteren wurde die DNase-Behandlung der Proben auf 45-60 Minuten ausgedehnt.

Das Protokoll zur weiteren Verarbeitung ist in großen Teilen an die „Standard Operating Procedures“ des „Institute for Genomic Research (TIGR)“ (pga.tigr.org/protocols.shtml) angelehnt. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem „First Strand cDNA Synthesis“-Set (Invitrogen) oder dem „cDNA Synthesis Kit“ (Bioline). Startmaterial zur Generierung von cDNA waren 15-20µg gesamt RNA. Nukleotide (dNTPs) wurden über Bioline oder Ambion bezogen, wobei dTTP und Aminoallyl(aa)-dUTP in einem Verhältnis von 3:2 im Nukleotidmix eingesetzt wurden. Die Ansätze wurden nach der Depurinierung und Neutralisierung über MicroCon30-Säulen (Millipore, Eschborn) aufgereinigt. Die Aminoallyl-markierte cDNA erlaubte die chemische Kupplung von N-Hydroxysuccinimid(NHS)-aktivierten Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3/Cy5, GE Healthcare; DY-547/DY-647, Dyomics, Jena) unter alkalischen Bedingungen (0,1M Natriumcarbonat, pH 9,0). Die Proben wurden nach mindestens zweistündiger Inkubation im Dunkeln mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) gereinigt und die Inkorporation von Farbstoff am NanoDrop ND-1000 UV/Vis (Peqlab) bestimmt. Die vermessenen Proben wurden im Anschluss in einer SpeedVac eingetrocknet und in 60µL Hybridisierungspuffer aufgenommen. Zur Inkubation wurde ein Tecan HS400 Pro Hybridisierungsautomat mit folgendem Programm und Lösungen benutzt:

Tabelle 6: Belegung der Kanäle der Tecan HS400 Pro

Ch(annel) 1 – ddH ₂ O	Ch 2 – 5xSSC/0,2% SDS/ 3mg/mL BSA Fraktion V	Ch 3 – 2xSSC/ 0,1% SDS
Ch 4 – 0,2xSSC	Ch 5 – 0,1xSSC	

Tabelle 7: Programm zur Hybridisierung von Corning UltraGAPS

Program step	Temp	used Ch	Time in h:min:sec
1 - WASH	23 °C	Ch2	0:00:30
2 - WASH	45 °C	Ch2	0:00:60
3 - HYBRIDISATION	45 °C	Ch2	0:45:00
4 - WASH	45 °C	Ch2	0:00:20

5 - SAMPLE INJECTION	Agitation:	Yes	
6 - HYBRIDISATION	45 °C	Ch2	overnight
7 - WASH	45 °C	Ch2	0:01:00
8 - WASH (2x)	23 °C	Ch3	0:02:00
9 - WASH	23 °C	Ch4	0:01:00
10 - WASH	23 °C	Ch5	0:00:30
11 - SLIDE DRYING	30 °C		0:02:00

Die hybridisierten Microarrays wurden mit einem GenePix 4000B (Molecular Devices) bei einer Auflösung von 5µm gescannt und mittels GenePix Pro-Software von Wolfgang Schmidt-Heck (Abt. MAM) ausgewertet. Jeder Chip wurde dreimal gescannt, wobei die Laserleistung fixiert blieb und die elektronische Signalverstärkung mittels PMTs so angepaßt wurde, dass sich sowohl schwache, als auch sehr starke Spots nicht in der Sättigung befanden und detektiert werden konnten.

Proteinchemische Methoden

Herstellung von Proteinrohextrakten aus *A. fumigatus*

Gefrorenes Mycel von *A. fumigatus* wurde mit flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zermahlen. Das Mycelpulver wurde mit einem Proteinextraktionspuffer für PKA-Aktivitätsbestimmungen (25mM Tris/HCl pH 7,4, 0,5mM EGTA; 0,5mM EDTA; 10mM β -Mercaptoethanol; Proteaseinhibitoren) oder für die Bestimmung der PKC-Aktivität (25mM Tris/HCl pH 7,4; 0,5mM EGTA; 0,5mM EDTA; 0,05% Triton X-100; 10mM β -Mercaptoethanol; Proteaseinhibitoren) versetzt und vermischt. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Sedimentierung unlöslicher Bestandteile durch Zentrifugation bei 13.000 U/min bei 4°C für 15 min. Der Überstand enthielt die Fraktion der löslichen Proteine von *A. fumigatus*.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Ermittlung der Konzentration von *A. fumigatus* Proteinextrakten nach Bradford (1976) wurden Proben 1:1000 resp. 1:2500 verdünnt. 500µl des verdünnten Proteinextraktes wurden mit 500µL „Coomassie Plus“-Reagenz (Perbio Science; Bonn) in einer Küvette vermischt. Die Absorption bei 595nm wurde photometrisch ermittelt und die Proteinkonzentration mittels einer Eichgeraden und des Verdünnungsfaktors der Proteinextrakte berechnet.

Bestimmung der Proteinkinase A – Aktivität

Mittels des „PepTag Non-Radioactive cAMP-Dependent Protein Kinase Assay“ (Promega) erfolgte die Bestimmung der PKA-Aktivität in *A. fumigatus*-Proteinextrakten. Als Phosphatgruppenakzeptor dient ein synthetisches Kemptid, welches an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Das Peptid verfügt über eine Konsensus-Sequenz (Aminosäuren: LRRASLG) der PKA. Durch die Phosphorylierung des Kemptids ändert sich das Laufverhalten bei der Elektrophorese, das Kemptid wandert zur Anode. Die Durchführung des „Assays“ erfolgte nach Herstellerangaben. Protein-Rohextrakte wurden auf 3 mg/mL eingestellt (30 µg Gesamtprotein pro Probe). Eine Aktivierung der PKA erfolgte durch Zugabe von 1 µM cAMP zum Ansatz. Die Visualisierung der fluoreszierenden Peptide im Agarosegel erfolgte durch UV-Bestrahlung.

Bestimmung der Proteinkinase C – Aktivität

Mittels des „PepTag Non-Radioactive PKC Assay“ (Promega) erfolgte die Bestimmung der PKC-Aktivität in *A. fumigatus*-Proteinextrakten. Das synthetische Peptid trägt eine PKC-Konsensussequenz bestehend aus den Aminosäuren. PLSRTLSTVAAK. Die Durchführung mit 30 µg Proteinextrakt pro Probe erfolgte nach Herstellerangaben. Zur Aktivierung der Proteinkinase C wird Phosphatidylserin eingesetzt.

Probenvorbereitung für 2D-Gelelektrophorese

Gefrorenes Mycel von *A. fumigatus* wurde unter flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zermahlen. 100mg wurden in einem 2mL Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 300 µL eisgekühlter TCA-Lösung versetzt (3,99g Trichloressigsäure; 0,09g DTT lösen in 30mL Aceton) und auf dem Vortex gemischt. Der Ansatz wurde für mindestens sechs Stunden, besser über Nacht, bei -20 °C inkubiert. Die Probe wurde bei 4 °C für 15 Minuten bei 12000g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit der eisgekühlten TCA-Lösung resuspendiert und jeweils unter o.g. Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und restliches Aceton in einer SpeedVac entfernt. Das trockene Pellet wurde in 300 µL Lysepuffer aufgenommen und anschliessend für 10 Minuten in einem Ultraschallbad behandelt. Die Probe wurde wieder für eine Stunde bei -70 °C eingefroren, danach bei Raumtemperatur aufgetaut und für 20 Minuten bei 20 °C und maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Der Überstand enthielt das lösliche Protein und wurde weiterverwendet.

Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension, IEF)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in der 1. Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt mittels des „IPGphor II“ (GE Healthcare Bioscience, Freiburg) auf Keramikträger nach Anweisungen des Herstellers. Die Durchführung beruhte auf dem für *A. fumigatus* optimierten Protokoll von Kniemeyer et al. (2005). Die isoelektrische Fokussierung (IEF) erfolgte auf 24 cm Gelstreifen mit einem nicht-linearen pH-Bereich von 3-11 („Immobiline DryStrip“, GE Healthcare Bioscience, Freiburg). Die Streifen wurden vor der IEF in je 450µl Rehydrierungspuffer unter Verwendung von „DeStreak Reagent“ (Olsson et al., 2002) und „IPG Buffer“ (GE Healthcare Bioscience, Freiburg) über Nacht rehydriert. 300µl Proteinprobe wurden mittels anodischem „cup-loading“ auf einen Streifen geladen. Nach Überschichtung der Streifen mit „Immobiline DryStrip Cover Fluid“ (GE Healthcare Bioscience, Freiburg) erfolgte die IEF bei 20°C mit 50µA pro Streifen und 42.650 Vhr mit folgendem Programm über Nacht: 4 h bei 300 V, 3 h bei 600 V, 4 h bei 1000 V, 3 h bei 8000 V und 24000 V/h bei 8000V. Nach Abschluss des IEF-Programms wurden die Streifen zuerst in 25 mL Äquilibrierungspuffer mit DTT reduziert und dann in 25mL Äquilibrierungspuffer mit Jodacetamid alkyliert. Die äquilibrierten Streifen wurden für die SDS-PAGE der 2. Dimension verwendet.

SDS-PAGE (2. Dimension)

In der zweiten Dimension wurden die Proteine nach Größe durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Diese wurde mit dem „Ettan DALT System“ der Firma GE Healthcare Bioscience (Freiburg) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für das Gießen 12,5%iger 1mm starker SDS-Gele wurden folgende Reagenzien zusammengemischt: 189ml Acrylamid, 113ml 1,5M Tris/HCl pH 8,5, 101ml H₂O, 38ml Rhinohide (Invitrogen) 4,5ml 10%ige SDS-Lösung, 62µl TEMED (100%; Roth, Karlsruhe), 4,5ml 10%ige Ammoniumpersulfatlösung.

Für die SDS-PAGE wurden die nach der IEF äquilibrierten Gelstreifen in 1x SDS-Elektrophoresepuffer gespült und anschließend auf die Oberkante von zwischen den Glasplatten polymerisierten Gelen gelegt. Die Streifen wurden mit Agarose überschichtet und zusammen mit den Gelen in eine mit 1xSDS-Elektrophorese-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer überführt. Die obere Kammer wurde mit 2xSDS-Elektrophorese-Puffer gefüllt. Die Proben wurden mit 2 Watt pro Gel für 45 Minuten einlaufen gelassen und nachfolgend die Elektrophorese mit 17 Watt pro Gel für ca. 4 Stunden durchgeführt.

Kolloidale Coomassie-Färbung

Die Färbung der Proteine erfolgte durch Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (Roth, Karlsruhe) nach Neuhoff et al. (1988).

2D-Gele wurden für zwei Stunden in Fixierlösung geschwenkt, zweimal 20 Minuten in H₂O gewaschen und über Nacht in Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung inkubiert. Die Gele wurden für 5-10 Minuten in Neutralisierungslösung gelegt und mit Waschlösung für 1-2 Stunden entfärbt. Danach waren die aufgetrennten Proteine deutlich als „Spots“ sichtbar. 2D-Gele wurden in Stabilisierungslösung bei 4 °C gelagert.

Auswertung von 2D-Gelen

Die Coomassie-gefärbten Gele wurden mit einem Durchlichtscanner Typ „Image Scanner“ (GE Healthcare Bioscience, Freiburg) und der „Labscan Software 5“ (GE-Healthcare) mit einer Auflösung von 300 dpi eingescannt. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe der „Delta 2D-Software“ (Version 3.6, Decodon, Greifswald). Die Gele wurden nach Normalisierung der Intensitäten und der Subtraktion des Hintergrundes überlagert und einander entsprechende Protein-„Spots“ unter Verwendung der „Group-Warping-Strategie“ zur Deckung gebracht. Nach dem „Warping“ wurde aus allen Gelen ein Fusionsgel erstellt, welches die durchschnittlichen Volumina der „Spots“ an den entsprechenden Positionen im Gel wiedergibt. Die Protein-„Spots“ wurden von der Software nach dem % Volumen-Kriterium quantifiziert, wobei der „ratio“-Wert die Unterschiede zwischen den Volumina anzeigte. Für jeden „ratio“-Wert wurde der t-Wert angegeben, wobei nur „ratio“-Werte mit einem t-Wert ≥ 95 ($P < 0,05$) als signifikant angesehen wurden. Für eine signifikante Auswertung wurden 3 Replika von 3 Gelen eines Stammes hergestellt und für das Fusionsgel davon 8 Gele je Stamm verwendet.

Identifikation der Proteine

Zur Identifikation von Proteinen wurden Protein-„Spots“ aus dem Gel manuell ausgeschnitten und nach dem Protokoll von Shevchenko et al. (1996) tryptisch verdaut. Dazu wurden die Gelstücke einzeln mit je 500 µl 50 mM NH₄HCO₃/Acetonitril (1:1) für 15 Minuten gewaschen, die Flüssigkeit abgenommen und mit je 100 µl Acetonitril dehydriert. Nach Abnahme der Flüssigkeit wurden die Gelstücke mit je 100 µl 50 mM NH₄HCO₃ für 5 Minuten inkubiert, je 100 µl Acetonitril zugegeben, und für weitere 15 Minuten inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit entfernt, und die Gelstücke wurden erneut mit Acetonitril dehydriert.

Die Gelstücke wurden getrocknet und mit 20µl Trypsin-Lösung („Sequencing Grade Modified Trypsin“, Promega), die nach Angaben des Herstellers hergestellt wurde, versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Flüssigkeit abgenommen und je 2-3µl 25mM NH_4HCO_3 zugegeben. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37 °C. Zur Extraktion der Proteine wurden die Gelstücke mit je 15-20µl 0,1% TFA / Acetonitril (1:1) bedeckt, für zehn Minuten im Ultraschallbad und danach eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Vortex inkubiert.

Die Identifikation der Proteine erfolgte durch Analyse der tryptisch verdauten Gel-„Spots“ mittels Massenspektrometrie (MS). Dazu wurden je Protein-„Spot“ 1,5µl Matrixlösung und 1,5µl der verdauten Protein-„Spots“ auf ein MS-Target (MTP anchor chip 384, Bruker Daltonics, Bremen) pipettiert. Die MS-Messungen und die Identifizierung der Peptidsequenzen erfolgte mittels MALDI TOF/TOF-Analyse mit dem Gerät „Ultraflex I“ (Bruker Daltonics, Bremen). Die erhaltenen Spektren wurden durch NCBI-Datenbanksuche mittels „MASCOT 2.1.0“ (Matrix Science, UK) identifiziert, wobei ein „MASCOT score“ von $P < 0,05$ als signifikant für die Datenbanktreffer verwendet wurde. Folgende Parameter wurden verwendet: Cystein als S-Carbamidomethyl-Derivat, Methionin in oxidierte Form (variabel), maximal eine ausgelassene Spaltungsstelle beim Verdau, Peptid-Massen-Toleranz von 200ppm. Mit Hilfe der Software „Protein Scape 1.3“ (Protagen, Dortmund) wurde die Datenbanksuche verfeinert.

Mikroskopie & Photographie

Photographie

Bilder von Agarplatten wurden mithilfe von Digitalkameras (Canon Powershot A75 / Nikon D100) angefertigt und per ImageJ (rsb.info.nih.gov/ij/) bearbeitet.

Mikroskopie

Durchlichtmikroskopie wurde an einem Leica 4500B (Leica, Bensheim) oder einem Carl Zeiss LSM 5 Live (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen) durchgeführt. Bildverarbeitung fand mittels der System-eigenen Software statt.

Fluoreszenzfärbung

Chitin wurde mit Calcofluor White (Endkonzentration $\sim 1\mu\text{g/mL}$) angefärbt. Hierzu wurde ein entsprechendes Aliquot des Stock (10 mg/mL) direkt in das Kulturmedium gegeben,

Um Vakuolen anzufärben wurde das Medium mit dem lipophilen Farbstoff FM4-64 (Endkonzentration 1 µg/mL) versetzt und nach 5-minütiger Inkubation mikroskopiert. Der Farbstoff wird mittels Endocytose aufgenommen und färbt damit initial Vesikel und im weiteren Verlauf Vakuolenmembranen.

Konfokale (Fluoreszenz-)Mikroskopie

Zur Aufnahme von Fluoreszenz- oder konfokalen Bildern wurde ein Carl Zeiss LSM 5 Live – System benutzt. Anregungslaserlinien waren 405nm für Calcofluor, 488nm für FITC/eGFP oder 532nm für FM4-64. Die Verarbeitung der Bilder / Bildstapel erfolgte mit der System-eigenen Software.

Virulenzstudien

In Zusammenarbeit mit der Gruppe um Dr. vet. Ilse Jacobsen wurden Virulenzstudien in einem murinen Infektionsmodell nach Liebmann (2003, 2004) durchgeführt.

Chemikalien und Enzyme

Enzyme zur Nukleinsäuremodifikation und Restriktionsendonucleasen wurden bei folgenden Herstellern bezogen: New England Biolabs (Frankfurt,) Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Invitrogen (Karlsruhe), Bioline (Luckenwalde), Promega (Mannheim) oder Fermentas (St.Leon-Rot). Feinchemikalien stammten von Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Cayla Invivogen (Toulouse, Frankreich), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Applichem (Gehrden). Kits und DNA-Größenmarker wurden von folgenden Herstellern bezogen: Peqlab (Erlangen), Quiagen (Hilden), Invitrogen (Karlsruhe), Roche Diagnostics (Mannheim), Fermentas (St.Leon-Rot) und GE Healthcare Bioscience (Freiburg). Oligonukleotide wurden bei MWG (Martinsried) synthetisiert.

Auftragssequenzierung wurde bei Medigenomix (jetzt Eurofins, Martinsried) durchgeführt.

C. ERGEBNISSE

Identifizierung putativer GPCRs in *A. fumigatus*

Für den human pathogen Deuteromyceten *Aspergillus fumigatus* wurde durch Liebmann et al. (2004) die Bedeutung der cAMP-Signalkaskade für Morphogenese und Virulenz nachgewiesen. Die externen Signale und die Rezeptoren, die diese sensieren und weiterleiten, sind aber weiterhin unbekannt. Da die Kaskade über G-Proteine aktiviert wird, wurde angenommen, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) diese Aufgabe übernehmen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb putative GPCRs in *A. fumigatus* identifiziert und deren Funktion charakterisiert werden. Hierzu wurde das sequenzierte *A. fumigatus*-Genom mittels Proteinsequenzen bekannter Rezeptoren aus z.B. *Magnaporthe grisea* auf das Vorhandensein von GPCR-kodierenden Sequenzen analysiert. Außerdem sollte eine mögliche Verbindung zwischen identifizierten Transmembranrezeptoren und Komponenten der PKA-Signalkaskade untersucht werden.

Identifizierung von Transmembranrezeptoren

Die Arbeit von Kulkarni et al. (2005) war die Erste, in der gezielt ein vollständig sequenziertes Pilzgenom (*M. grisea*; Dean et al., 2005) auf das Vorhandensein von Sequenzen untersucht wurde, die für putative Transmembranrezeptoren kodieren. Als Vorlage dienten die bis dato bekannten GPCRs aus Pilzen, cAMP-Rezeptoren aus *Dictyostelium discoideum* und ein humaner Steroidrezeptor. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine ähnliche Analyse des *A. fumigatus*-Genoms durchgeführt. Interessanterweise führte nur die Verwendung der *M. grisea* Proteinsequenzen zu signifikanten Treffern in den *A. fumigatus* Genom-Datenbanken, nicht aber die Verwendung von z.B. Car2 aus *D. discoideum* oder dem Glukoserezeptor Gpr1p aus *Saccharomyces cerevisiae*.

Die öffentlich zugänglichen Datenbanken des „J. Craig Venter Institute (JCVI)“ (<http://www.tigr.org>) und des „Wellcome Trust Sanger Institute“ (www.sanger.ac.uk) wurden für die BLASTP-/TBLASTN-Analysen (Altschul et al., 1997) genutzt.

Zur Identifizierung der kodierenden Bereiche wurden die von Kulkarni et al. (2005) veröffentlichten Proteinsequenzen aus *M. grisea* herangezogen und eine TBLASTN-Analyse

(Aminosäure (As)- gegen translatierte Nukleotidsequenz) durchgeführt. Bei signifikanten Treffern in der Datenbank („E-value“ $< e^{-50}$) wurden die betreffenden Gensequenzen (± 2000 Basenpaare) extrahiert. Web-Server wie GENSCAN (<http://genes.mit.edu>) oder AUGUSTUS (<http://augustus.gobics.de>) können aufgrund der Nukleotidsequenz Spleiß-Signale, Poly-A-Sequenzen und den Transkriptionsstart vorhersagen. Somit konnte *in silico* ein mögliches Modell der jeweiligen Genstruktur erstellt werden. Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz wurde für weitere Untersuchungen herangezogen.

Die As-Sequenz wurde zum einen wieder für eine BLASTP-Analyse (Protein versus Protein) mit der öffentlichen Datenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) benutzt, um Hinweise auf die Korrektheit der Sequenz zu erhalten. Zum anderen konnte mittels der Sequenz eine Vorhersage über konservierte Domänen, die Struktur und intrazelluläre Lokalisation des putativen Proteins erstellt werden. Hierbei spielte gerade die Topologie-Vorhersage eine wichtige Rolle, da für Transmembranrezeptoren wie GPCRs die Anordnung innerhalb der Membran ein wesentliches Charakteristikum darstellt. Programme wie Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>), TMHMM (<http://cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), TMPred (http://ch.embnnet.org/software/TMPRED_form.html) und TopPred (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>) dienten der Vorhersage möglicher sekundärer Proteinstrukturen und der Anzahl der transmembranen Domänen.

Falls die von GENSCAN oder AUGUSTUS erzeugten Sequenzen nicht zu einer GPCR-typischen Struktur führten, wurde, wenn möglich, manuell ein ORF konstruiert, der wiederum in BLASTP-Analysen mit der NCBI-Datenbank abgeglichen wurde. Lafon et al. (2006) wählten einen vergleichbaren Ansatz und hatten eine Suche nach GPCR kodierenden Loci in den Genomen von drei *Aspergillus*-Spezies (*A. oryzae*, *A. fumigatus* und *A. nidulans*), *Neurospora crassa* und *Fusarium graminearum* durchgeführt.

In Tabelle 8 sind die identifizierten, putativen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aus *A. fumigatus* mit Nomenklatur nach Lafon et al. (2006) aufgelistet. Die Existenz von Pheromonrezeptoren und anderer für die sexuelle Reproduktion nötigen Gene wurde bereits 2003 von Pöggeler in dem Deuteromyceten nachgewiesen. Des Weiteren wurden Proteine identifiziert, die cAMP-Rezeptoren aus *D. discoideum* ähneln (GprH/I/L). Eine weitere Gruppe beinhaltet die mPG („mammalian prostaglandin“-)ähnlichen Rezeptoren (GprO/P). In Säugern regulieren Prostaglandine als Liganden für GPCRs eine Vielzahl an Prozessen wie

Entzündungen oder Gefäßkonstriktion /-dilatation.

Lafon et al. (2006) identifizierten zusätzlich einen neuartigen Typus transmembraner Pilzrezeptoren (GprK), der an seinem C-terminalen, intrazellulären Ende eine RGS („regulator of G protein signaling“)-Domäne trägt. Außerdem konnte in der genannten Arbeit ein GPCR-artiges Protein abgeleitet werden, das eine Ähnlichkeit zu bakteriellen Rhodopsinen aufweist.

Tabelle 8: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in *A. fumigatus* mit Genlocus, Beschreibung laut NCBI-Datenbank und Bezeichnung nach Lafon et al. (2006)

Locus	Beschreibung laut NCBI	Klasse	Bezeichnung
AFUA_3G14330	Mating-type a-pheromone receptor PreA	Pheromon	GprA
AFUA_5G07880	Mating-type alpha-pheromone receptor PreB	Pheromon	GprB
AFUA_7G04800	Hypothetical protein	Kohlenstoff	GprC
AFUA_2G12640	Uncharacterised protein, putative	Kohlenstoff	GprD
AFUA_5G04100	PQ loop repeat protein	Stm1-ähnlich	GprF
AFUA_1G11900	PQ loop repeat protein, putative	Stm1-ähnlich	GprG
AFUA_5G04135	cAMP receptor-like protein, putative	cAMP	GprH
AFUA_3G00780	Putative uncharacterized protein	cAMP	GprI
AFUA_1G06840	Vacuolar membrane PQ loop repeat protein	Stm1-ähnlich	GprJ
AFUA_4G01350	Conserved hypothetical protein	RGS	GprK
AFUA_3G01750	G protein coupled receptor family protein	cAMP	GprL
AFUA_7G05300	Putative uncharacterized protein	-	GprM
AFUA_3G10570	Haemolysin-III channel protein Izh2, putative	mPG-ähnlich	GprO
AFUA_6G07160	IZH family channel protein (Izh3), putative	mPG-ähnlich	GprP
AFUA_7G01430	Fungal opsin	Opsin-ähnlich	NopA

In Tabelle 9 sind, soweit vorhanden, die konservierten Domänen nach PFAM („protein families“)-Klassifizierung und die Anzahl der vorhergesagten transmembranen Helices aufgeführt.

Tabelle 9: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in *A. fumigatus*; Bezeichnung, die Anzahl der transmembranen Domänen (TM), Länge in Aminosäuren und Klassifizierung nach PFAM ("protein families")

Locus	Bezeichnung	TM	Länge in Aminosäure	PFAM
AFUA_3G14330	GprA	7	460	STE3 – Pheromon A-Rezeptor
AFUA_5G07880	GprB	7	369	STE2 – Pheromon B-Rezeptor
AFUA_7G04800	GprC	7	445	7tm_1 – Rhodopsin-Familie
AFUA_2G12640	GprD	7	418	---
AFUA_5G04100	GprF	7	391	PQ-loop
AFUA_1G11900	GprG	7	431	PQ-loop
AFUA_5G04135	GprH	7	413	7tm_2 – Sekretin-Familie
AFUA_3G00780	GrpI	7	355	7tm_2 – Sekretin-Familie
AFUA_1G06840	GrpJ	7	326	PQ-loop
AFUA_4G01350	GprK	7	559	RGS-Domäne
AFUA_3G01750	GprL	7	384	7tm_2 – Sekretin-Familie
AFUA_7G05300	GprM	7	497	---
AFUA_3G10570	GprO	7	321	Hämolysin-III ähnlich
AFUA_6G07160	GprP	7	500	Hämolysin-III ähnlich
AFUA_7G01430	NopA	7	304	Bacteriorhodopsin

Die beiden größten Gruppen sind GprF/G/J, die eine PQ-loop-Domäne tragen, und GprH/I/L, die zur Sekretin-Rezeptorfamilie gerechnet werden.

Der PQ-loop ist eine konservierte Domäne ohne beschriebene Funktion. Rezeptoren der Sekretinfamilie zeichnen sich dadurch aus, dass der Aminoterminus an der Ligandenbindung und die dritte intrazelluläre Schleife des Rezeptors an der Interaktion mit G-Proteinen beteiligt ist. GprO und GprP gehören zur PFAM-Klasse PF03006, deren Namensgeber ein integrales Membranprotein mit hämolytischer Aktivität aus *Bacillus cereus* ist (Baida und Kuzmin, 1995).

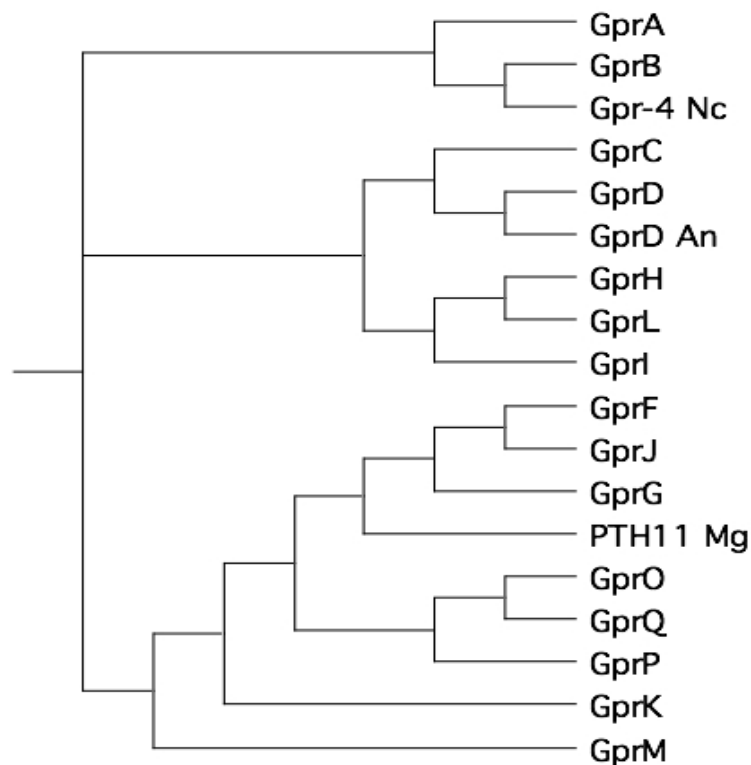


Abbildung 3: Phylogentischer Baum basierend auf Aminosäuresequenzvergleichen der vorher identifizierten GPCRs in *A. fumigatus* – Gpr-4 aus *Neurospora crassa*, GprD aus *A. nidulans* und PTH11 *M. grisea* dienten als „Außenseiter“

Der in Abbildung 3 gezeigte phylogenetische Baum wurde mittels des Moduls ALIGNX (Vector NTI Suite; Invitrogen) basierend auf dem CLUSTALW-Algorithmus erstellt. Zu den in Tabelle 9 gelisteten Proteinen (außer NopA) wurden Gpr-4 aus *Neurospora crassa*, GprD aus *A. nidulans* und PTH11 aus *M. grisea* in die Analyse einbezogen.

Die Pheromonrezeptoren GprA und GprB gruppierten mit Gpr-4 aus *N. crassa*, was verwundert, da dieser Rezeptor in *N. crassa* Kohlenstoffquellen sensiert und primär Wachstum und asexuelle Sporulation reguliert (Li und Borkovich, 2006). Die nach PFAM-klassifizierten Rezeptoren der Sekretinfamilie (cAMP-Rezeptor-ähnliche) GprF, GprG und GprJ und die beiden Kohlenstoff-Rezeptoren GprC und GprD bildeten je eine Untergruppe. Auch die weiteren Vertreter gruppierten sich entsprechend ihrer zuvor bestimmten Klassifizierung.

PTH11-ähnliche Transmembranrezeptoren

Eine weitere große Gruppe von Transmembranrezeptoren beinhaltet die PTH11-ähnlichen

Rezeptoren. PTH11 wurde als ein an der Virulenz beteiligtes Membranprotein aus *M. grisea* identifiziert, dessen Deletion zu Defekten in der Appressorienbildung führte. Die Defekte konnten aber durch die Gabe von extrazellulärem zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) abgeschwächt werden, so dass ein Einfluss auf die Proteinkinase A vermutet wird (de Zwaan et al., 1999). Kulkarni et al. (2005) konnten anhand dieses Prototypen eine Vielzahl (61) von PTH11-ähnlichen Proteinen im *M. grisea*-Genom ermitteln. Eine Untergruppe besaß zusätzlich einen Cystein-reichen (8 Cysteine) Aminoterminus (CFEM-Domäne), der innerhalb des Reiches der Pilze einzigartig ist. Diese CFEM-Domäne ähnelt aber der EGF („epidermal growth factor“)-Domäne, die wiederum typisch für Sekretinrezeptoren ist.

Mit Hilfe des PTH11-Proteins aus *M. grisea* als Vorlage konnten in den JCVI- und SANGER-Datenbanken mehrere ORFs in *A. fumigatus* identifiziert werden, die typische Charakteristika membranständiger Proteine aufweisen. Um CFEM-Domänen innerhalb der gefundenen Sequenzen zu finden, wurde u.a. eine BLAST-Analyse mit dem Cystein-reichen N-Terminus von PTH11 als Vorlage durchgeführt. Das für diese Domäne charakteristische Aminosäuremuster $(\text{PxC}[\text{A/G}]_{\text{x}_2}\text{Cx}_{8-12}\text{Cx}_{1-3}[\text{x/T}]\text{Dx}_{2-5}\text{CxCx}_{9-14}\text{Cx}_{3-4}\text{Cx}_{15-16}\text{C}$; x kann eine beliebige Aminosäure sein) konnte aber bei keinem der PTH11-ähnlichen Proteine in *A. fumigatus* nachgewiesen werden. Zur Vorhersage von transmembranen Helices wurden die Webserver Phobius / HMMTOP / TMHMM und TopPred herangezogen. So konnten noch 14 weitere putative GPCRs identifiziert werden, die aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten als PTH11-ähnliche Membranrezeptoren klassifiziert wurden. Einen Sonderfall stellte die Annotation des Proteins AFUA_4G06630 dar. Das 913 As-lange Protein wird als Zuckertransporter aufgrund einer konservierten Domäne, die sich über die C-terminalen 550 As erstreckt, klassifiziert. Die ersten 350 As kodieren für sieben Transmembran-Helices und haben hohe Sequenzähnlichkeit zu anderen PTH11-ähnlichen Proteinen, so dass angenommen wurde, dass es sich hierbei um eine fehlerhafte automatische Annotation handelt (Daten nicht gezeigt).

Das Ergebnis der Topologievorhersage ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: PTH11-ähnliche Rezeptoren in *A. fumigatus* und die Anzahl der transmembranen Domänen nach Phobius/HMMTOP/TMHMM/TopPred

Locus ID	Beschreibung laut NCBI	PHOBIUS	HMM TOP	TMHMM	Top PRED
AFUA_4G03540	integral membrane protein, putative	7	7	7	7
AFUA_7G00930	integral membrane protein	7	7	6	7
AFUA_8G05510	integral membrane protein	7	7	7	7
AFUA_5G02860	integral membrane protein	7	7	7	7
AFUA_3G01200	integral membrane protein Pth11-like	7	7	7	7
AFUA_7G06660	hypothetical protein	7	7	7	7
AFUA_7G06130	plasma membrane protein Pth11-like	7	7	7	7
AFUA_6G11560	integral membrane protein	7	7	7	6
AFUA_6G13800	integral membrane protein Pth11-like	7	7	6	7
AFUA_4G06630	hypothetical protein	7	7	6	7
AFUA_1G14080	integral membrane protein Pth11-like	7	7	7	7
AFUA_5G13725	integral membrane protein	7	7	7	7
AFUA_5G06670	integral membrane protein	7	7	7	7
AFUA_2G15440	integral membrane protein	5	7	7	7

Charakterisierung putativer GPCRs in *A. fumigatus*

Vertreter der einzelnen Gruppen von Rezeptoren wurden ausgewählt und deletiert. GprB (Pheromon), GprC und GprD (Kohlenstoff), GprG (Stickstoff) und GprO und GprP (Prostaglandin) wurden in *A. fumigatus* deletiert. Zusätzlich wurden zwei weitere G α -Protein-Untereinheiten (GpaA und GpaC) deletiert, um die Möglichkeit zu haben, eine direkte Verbindung aufgrund des beobachteten Phänotyps zwischen Rezeptor- und G-Protein-Deletionsmutanten zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

Da nach einem GPCR gesucht wurde, der die cAMP-PKA-Signalkaskade reguliert, wurde der Fokus auf die beiden putativen Kohlenstoff-Rezeptoren GprC und GprD gelegt. In *S. cerevisiae* bildet der Glukoserezeptor Gpr1p zusammen mit der G-Protein α -Untereinheit Gpa2p eine funktionale Einheit (Xue et al., 1998). So wurde als Hypothese angenommen, dass das *A. fumigatus* G α -Protein GpaB (Homolog zu Gpa2p) ebenfalls Kohlenstoff-Sensoren als Rezeptoren (GprC/D) benötigt.

Im direkten Vergleich der drei Proteine GprC und GprD aus *A. fumigatus* und Gpr1p aus *S.*

cerevisiae war aber nur geringe Ähnlichkeit feststellbar (GprC/GprD zu Gpr1p: jeweils 10%). Dieser Unterschied war ebenfalls in der Struktur ersichtlich, da der Glukoserezeptor aus *S. cerevisiae* nahezu doppelt so lang ist (ca. 960 zu 420 As) und sich durch einen über 500 As langen intrazellulären Carboxyterminus von GprC und GprD unterscheidet.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden *A. fumigatus* Rezeptoren ergab 46% identische und 63% ähnliche Aminosäuren. Die Analyse der beiden Sequenzen mittels CLUSTALW2 ergab, dass die Transmembran-Bereiche die höchste Sequenzähnlichkeit aufweisen (Abb. 4):

GprC AfuA7G04800	-MSLFQLLYQAGARQEESHGLSRRLAYTEGGITYDIDPLPVAQHKGLIAV	49
GprD AfuA2G12640	MTSLVRTL LLLRSENGDKPYLT SRSQEAQP-PTFADEPLMGSLR AGFTAI	49
	**.: * :.: .: *: * :.: *: : ** : : *: **:	
GprC AfuA7G04800	AVMATLSFIATLALICFITY RLVFWRSNYQRY YIGYNOYIILIYNLVIADI	99
GprD AfuA2G12640	GAVALCSWIVTFSLISFLTY RFIFWQRYHKR PLAHNQYVLLIYNLLLVDI	99
	...*: *:*.*:*.*:*.*:*.*:*.*: :*: :*:*:*:*:*:*:*:*:	
GprC AfuA7G04800	QOSLAFLICIKWIAEDKIEASSACFLQGFWLQIGDPASGLFVLAI AIHT	149
GprD AfuA2G12640	QOATAFLLC LHWFARGGVNYP SAACVLQGW WIQTADPGSGLFVLAI AIHT	149
	.: *:*:*:*:*:*. :.: .****.*****:*:*. :*. :*****	
GprC AfuA7G04800	FLLVAMGHKLSYRIFVLGVVGLWVFVAILVVIPLAAHGRFVFIPSGAWCW	199
GprD AfuA2G12640	GAVVL RGRQLPYTT FVWCVVGLWAFIILLGLIAVGLY GSRTSVIS-----	194
	:* *:*.*: * * ******: *: :*. :. : *	
GprC AfuA7G04800	ISEEYEAVRLWTHY IWIFLAEFGTVCLYAVMWF QLRAQIKQSAILGSNHT	249
GprD AfuA2G12640	-----EAG--WGHY VWIFLSEFGTILLYGIMFFYL RRQMKQAAALRQNHQ	237
	** * ***:*****:*****: **.:*: * * *:***: * * .**	
GprC AfuA7G04800	ASLKRLRR VIGYMYIPIAYIVLSLPLAAG RMATARGNTPS LAYFCVAGA	299
GprD AfuA2G12640	ESLNRLNR VVVMYIYPLVYVLLSLPLA EGRMSTARHVPS KEYFAAAGA	287
	:*.: *****:*. :*:***** ***:*** .** **..**	
GprC AfuA7G04800	LITSSGLVDVLLYTLT RRNLILESEPSDHSYNRFASSKNRRNDNHLTTI	349
GprD AfuA2G12640	LMALSGLVDVVVYTLT RRHLLLDTEVSTSDRY--YAHTGSNLYNTHVSTT	335
	*.: *****:*****:*****: * .. * : * : .. :.***:	
GprC AfuA7G04800	TADPKHTRTDISVLRTRRGHDEEEDHVDSPTRDGSTDNIVQPG-----VE	394
GprD AfuA2G12640	VAGPESKKS RVKS-RLRRGMSINDTVLD-DRGDSTEDIVPKGPKGAAME	383
	.*.*: :.: .: * ** * . : * * . *..***: ** * :*	
GprC AfuA7G04800	LAPMGK-VFQHTTIEITHEPAYPEAEGSDRSSKDSLQRPVKSHDNASRMWGR	445
GprD AfuA2G12640	LGHMAHGVIYQETTIEITHEAAEPEQ-----ALRKPNR-----LSR--	418
	*. *: *:*.*****.* ** :***: : **	

Abbildung 4: Alignment der Aminosäuresequenz von GprC und GprD aus *A. fumigatus* (* = konservierte As / : = sehr ähnliche As / . = ähnliche As; hervorgehoben sind die Transmembran-Domänen)

Auch die Sekundärstruktur der Proteine ist vergleichbar. So weisen beide Rezeptoren einen ca. 40 As-langen extrazellulären N-Terminus auf, dem sieben Transmembran-Domänen von je ca.

20 As folgen. Die einzelnen Helices sind durch kurze Loops miteinander verbunden, so dass Interaktionspartner wahrscheinlich nur mit dem bei beiden Rezeptoren 100-150 As-langen intrazellulären Terminus interagieren können. Die Strukturvorhersage des TMHMM-Webservers veranschaulicht die hohe Struktur-Ähnlichkeit (Abb. 5). Somit verstärkt die Verteilung der Domänen und die Anordnung der transmembranen Helices die Annahme, dass es sich bei den Proteinen GprC (AfuA_7G04800) und GprD (AfuA_2G12640) um putative G-Protein-gekoppelte Rezeptoren handelt.

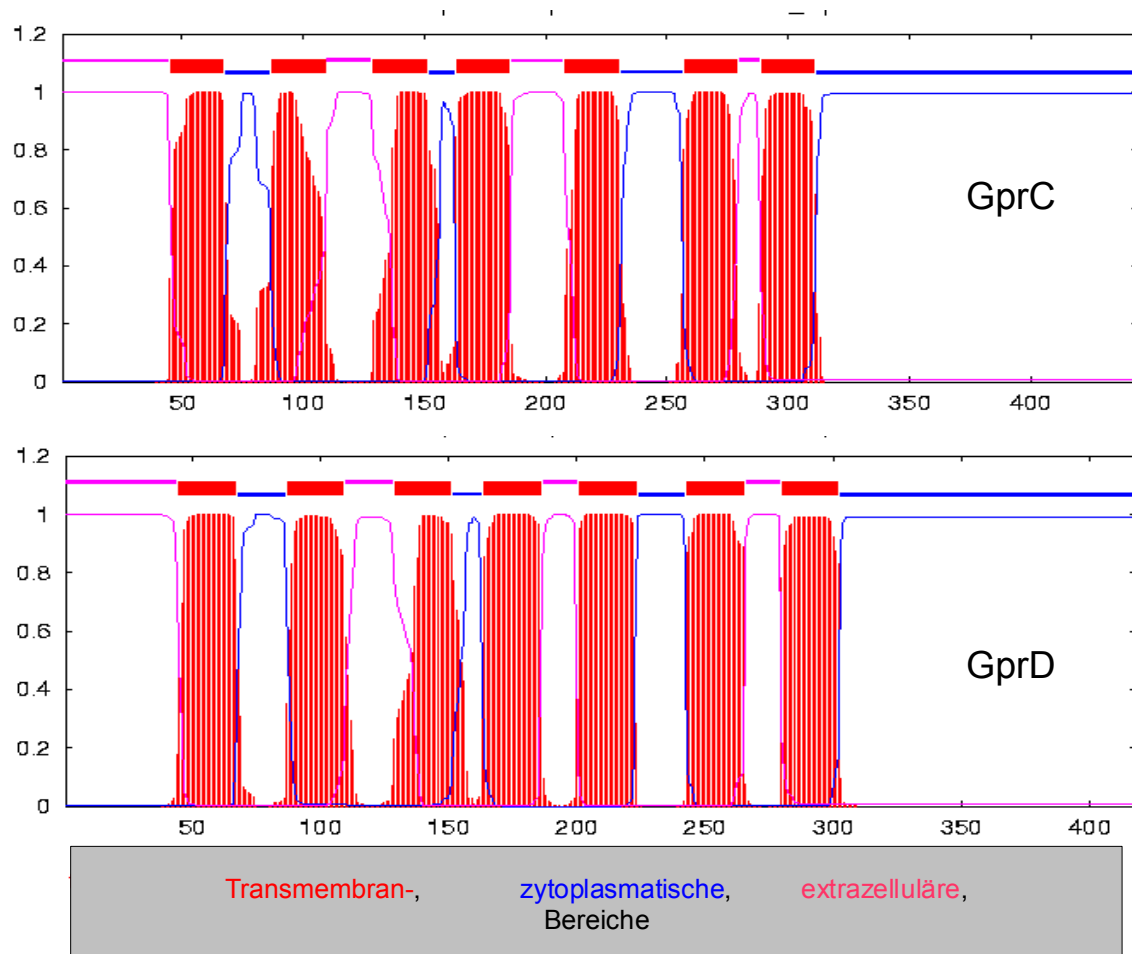


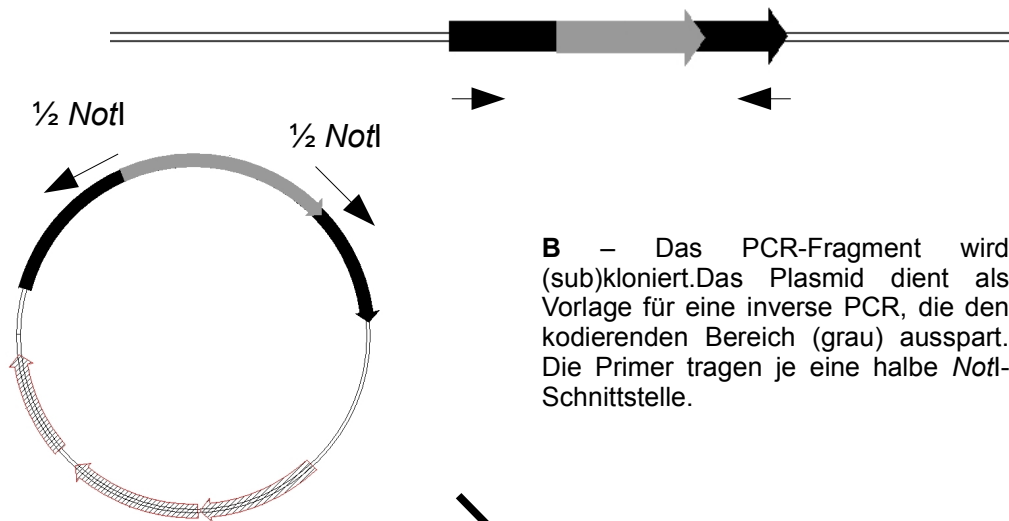
Abbildung 5: Topologie-Verteilung der G-Protein- gekoppelten Rezeptoren GprC (AfuA_7G04800) und GprD (AfuA_2G12640) laut TMHMM-Vorhersage: Das Diagramm zeigt die Wahrscheinlichkeit (Y-Achse) der intra-/extrazellulären Verteilung der Helices über die Länge der Aminosäuresequenz (X-Achse).

Deletion der heptahelikalen Rezeptoren GprC und GprD

Um eine funktionelle Charakterisierung zu ermöglichen und einen Zusammenhang mit der cAMP-PKA-Signalkaskade nachzuweisen, wurden die betreffenden Gene, *gprC* und *gprD*, in *A. fumigatus*-Stamm CEA17 Δ akuB^{KU80} deletiert (da Silva-Ferreira et al., 2006). Der verwendete Stamm unterscheidet sich vom Wildtyp CBS114.89/DAL darin, dass eine Untereinheit des „non-homologous endjoining“ DNA-Reparatur-Apparates deletiert wurde. Somit wird homologe Rekombination bei der DNA-Integration bevorzugt. Die Deletionskonstrukte wurden nach gleichem Muster hergestellt.

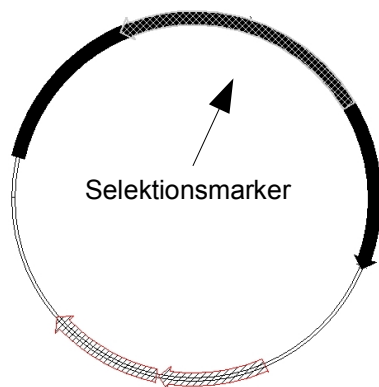
Der schematische Ablauf der Konstruktion der Deletionskonstrukte ist in Abb. 6 dargestellt. Zuerst wurde der kodierende Bereich inklusive flankierender Sequenz von je ca. 1000 bp per PCR amplifiziert und in einen pCR-TA-Vektor (Invitrogen) kloniert. Danach erfolgte eine inverse PCR, die den kodierenden Bereich ausspart. Hierbei wurden Oligonukleotide verwendet, die jeweils eine halbe Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *NotI* (CCGC) aufwiesen. Das lineare PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel gereinigt, eluiert und religiert. Da die Oligonukleotide, die in der inversen PCR eingesetzt wurden, keine 5'-Phosphatgruppen trugen, wurde dem Ligationsansatz zusätzlich eine T4-Polynukleotidkinase (PNK) beigefügt. Die T4-PNK überträgt den γ -Phosphatrest von ATP auf das 5'-Ende des linearen PCR-Produktes, so dass eine Ligation mittels T4-Ligase stattfinden kann. Nach Transformation von *E. coli*, wurde das Fragment mittels *EcoRI* in den pUC18-Vektor subkloniert. Der erhaltene Vektor konnte mit *NotI* linearisiert werden und mit einem ebenfalls *NotI*-geschnittenen Markergen (*pyrG* oder *hph*) ligiert werden. Das fertige Deletionskonstrukt, bestehend aus den Flanken und dem Selektionsmarker, wurde entweder durch Restriktion des entsprechenden Plasmids oder durch eine PCR mit einer „proof reading“-Polymerase erhalten. Nach Transformation von *A. fumigatus* wurden putative Transformanten mindestens zweimal unter stringenten Selektionsbedingungen passagiert.

A – Der genomische Locus des zu deletierenden Gens (grau) mit flankierenden Bereichen (schwarz) wird mittels PCR amplifiziert (schwarze Pfeile = Primer).



B – Das PCR-Fragment wird (sub)kloniert. Das Plasmid dient als Vorlage für eine inverse PCR, die den kodierenden Bereich (grau) ausspart. Die Primer tragen je eine halbe *NotI*-Schnittstelle.

C – Das so erhaltene Plasmid trägt nur die Flanken des Gens mit einer Restriktionsschnittstelle zum Einsetzen des Selektionsmarkergens.



D – Nach der Ligation mit einem Selektionsmarkergen dient das Plasmid als Vorlage für eine PCR, um Marker und Flanken zu amplifizieren.



E – Das PCR Produkt wird aufgereinigt und kann zur Transformation von *A. fumigatus* benutzt werden. Als Marker dienen *pyrG* (zur Komplementation einer Uracil-Auxotrophie) oder *hph/ptrA* die Resistenz gegenüber den Antibiotika Hygromycin resp. Pyrimin verleiht.

Abbildung 6: Schematische Darstellung zur Erzeugung von Deletionskonstrukten

Putative Transformanten wurden in einer „Southern blot“-Analyse überprüft, um eine Einzelintegration des Deletionskonstruktes am gewünschten Genlocus nachzuweisen.

Um die homologe Rekombination am *gprC*-Locus nachzuweisen, diente der 5'UTR als Sonde, bei *gprD* wurde der 3'UTR als Sonde genutzt (Abb. 7A/B).

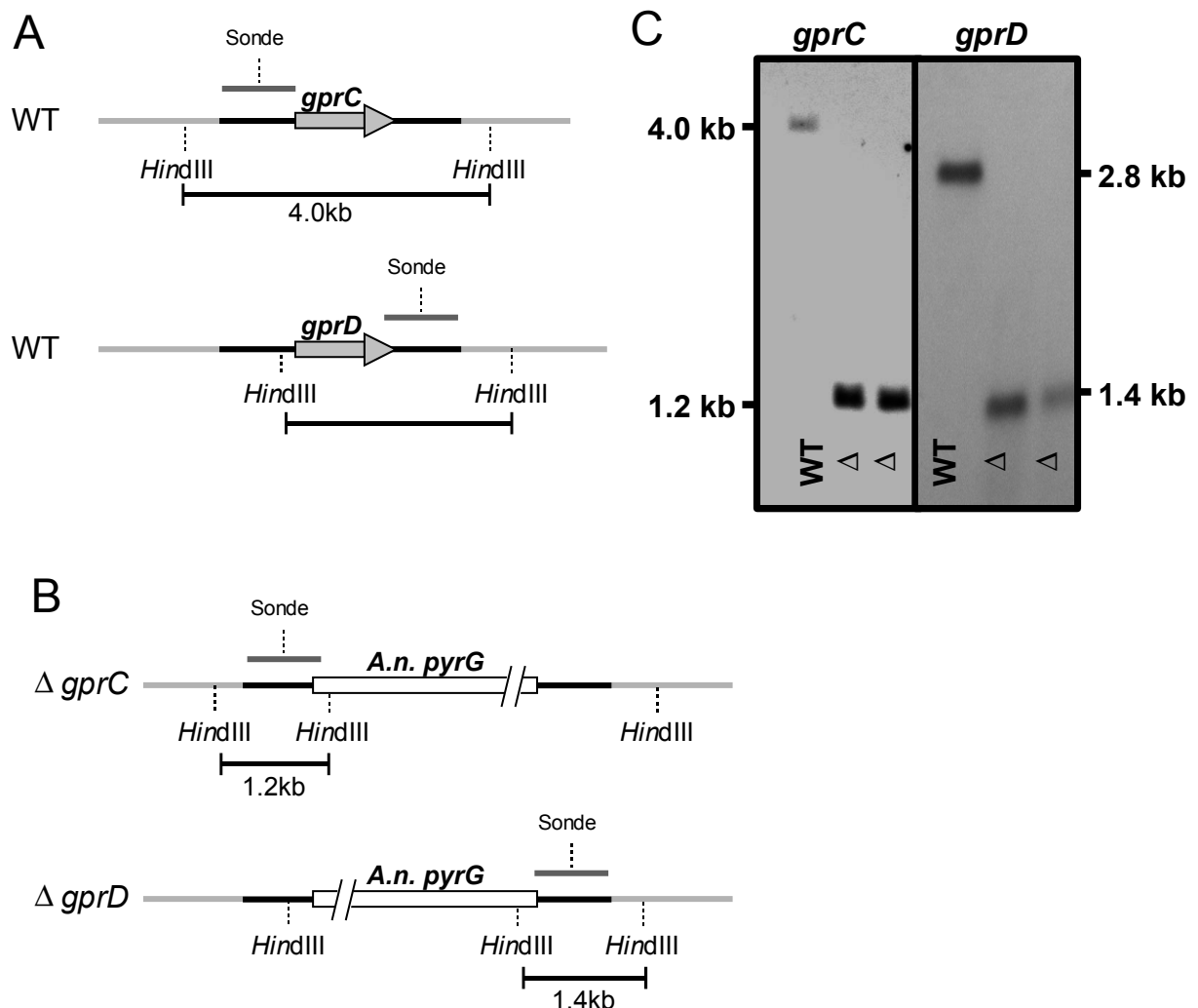


Abbildung 7: Schematische Darstellung des *gprC*- und *gprD*-Locus im Wildtyp (A) und den jeweiligen Deletionsmutanten (B). „Southern blot“-Analyse zum Nachweis der Integration am Locus (C) - In (A) und (B) sind die chromosomalen Abschnitte von AfuA_7G04800 (*GprC*) und AfuA_2G12640 dargestellt .

(schwarze Abschnitte = flankierende Bereiche; probe = Sonde für „Southern blot“; *A.n. pyrG* = *Aspergillus nidulans* Orotidin-5'-monophosphatdecarboxylase-Gen

Jeweils ein Transformant mit der gewünschten Deletion wurde ausgesucht (Δ *GprC* bzw. Δ *GprD*). Um eine Komplementation der Deletion zu erzielen, wurden die jeweiligen Deletionsstämme mit einem PCR-Produkt, welches die flankierenden und den kodierenden Bereich des entsprechenden Gens, und dem Plasmid pSK275 (kodiert für *ptrA* aus *A. oryzae* (Kubodera et al., 2000), vermittelt Pyrithiaminresistenz) transformiert. Pyrithiamin-resistente

Transformanten wurden vereinzelt und auf eine erfolgreiche Integration des PCR-Produkts am Locus mittels „Southern blot“ überprüft. Für beide Deletionsmutanten konnten Komplementationsstämme (cGprC5A und cGprD40) hergestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Mikrobiologische Charakterisierung der Deletionsmutanten

Um einen ersten Hinweis auf den Phänotyp der Deletion des jeweiligen Transmembranrezeptors zu erlangen, wurden der Wildtyp und die beiden Mutanten Δ GprC und Δ GprD auf Agarplatten mit Minimalmedium bzw. Vollmedium (YEPD) inkubiert. Hierzu wurden 5000 Sporen in die Mitte einer Agarplatte getropft und bei 37 °C für 80 Stunden inkubiert.

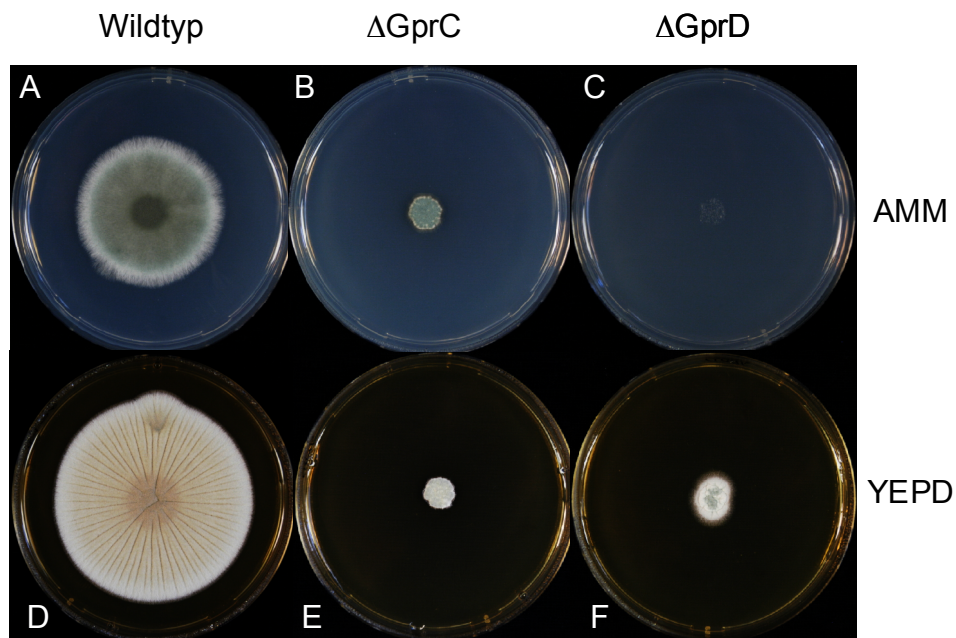


Abbildung 8: Wachstum des Wildtyps und der gprC-/gprD-Deletionsmutanten – (A) Wachstum des Wildtyps, (B) der Δ GprC- und (C) der Δ GprD-Mutante auf AMM bei 37 °C für drei Tage; D-F Wachstum der Stämme bei 37 °C auf YEPD.

Sowohl auf Minimalmedium als auch auf YEPD-Vollmedium war das Wachstum der Deletionsmutanten stark eingeschränkt. Im Gegensatz dazu wuchs der Wildtyp, wie erwartet, flächig und wies auf beiden Medien klar erkennbare Koloniebereiche auf (Abb. 8):

eine periphere Wachstumszone, gekennzeichnet durch weißes Mycel, einen zweiten Wachstumsring, in dem neben Mycel auch die Ausbildung von Konidien zu beobachten war, und dem Kernbereich, der sich durch starke Sporulation und die dichte, rauchgrüne Farbe (auf AMM) abhob.

Die Kolonie der Δ GprC-Mutante war innerhalb der drei Tage Inkubation sehr kompakt gewachsen und zeigte keine unterscheidbaren Bereiche, wobei auch die Farbe der Konidien heller und damit weniger reif als beim Wildtyp erschien (Abb. 8). Der Phänotyp der Δ GprD-Mutante war noch drastischer, das Wachstum sehr stark lokal begrenzt. Innerhalb der 80 Stunden Inkubation war keine Konidiophorenbildung zu beobachten.

Da der Wachstumsprozess stark verlangsamt schien, wurde die Germination der Sporen untersucht. Das Auskeimen der ruhenden Sporen erfolgt auf spezifische Umweltreize und wird maßgeblich durch die cAMP-PKA-Signalkaskade bestimmt (Liebmann et al., 2004).

Zur Bestimmung der Auskeimungsrate wurden $2 \cdot 10^7$ Sporen/mL in Sabouraud-Medium inkubiert. Zu jeder Stunde wurde eine Probe entnommen und es wurden mindestens 100 Sporen auf das Vorhandensein eines Keimschlauchs mikroskopisch untersucht.

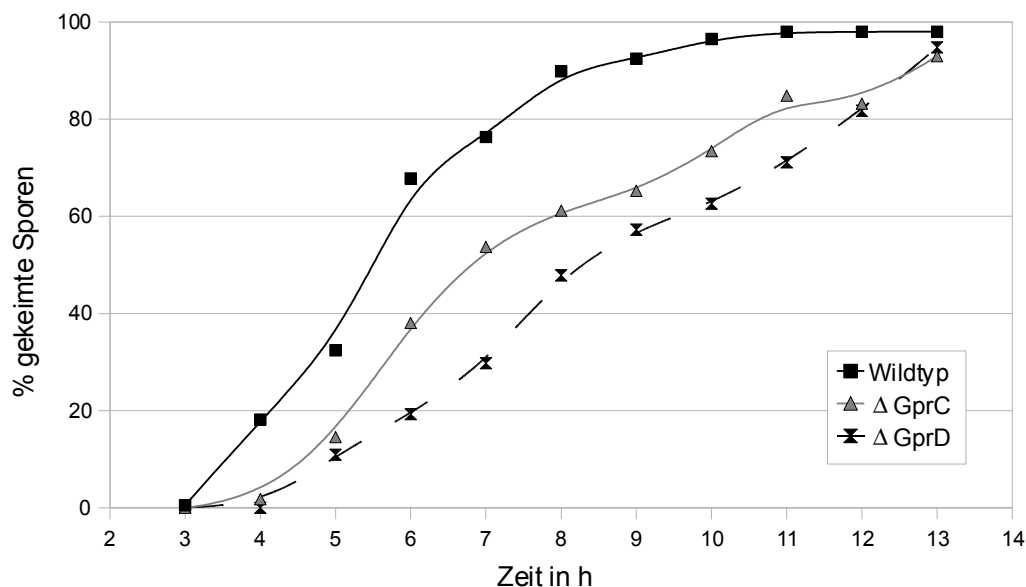


Abbildung 9: Auskeimungsrate des Wildtyps und der Stämme Δ GprC und Δ GprD –
Die Inkubation erfolgte in Sabouraud-Medium für den indizierten Zeitraum

Der Wildtyp erreichte 50% Germination bereits nach 5,5 Stunden, wohingegen die Stämme Δ GprC und Δ GprD ca. 7-8 Stunden benötigten (Abb. 9). Die vollständige Auskeimung (>90%) der beiden Deletionsmutanten dauerte fast doppelt solange wie beim Wildtyp (13h gegenüber 7h).

Der drastische Wachstumsdefekt zeigte sich ebenfalls bei der Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate. 500 Sporen in 2,5 μ L wurden auf Agarplatten getropft und die Durchmesser der Kolonien zu definierten Zeitpunkten ausgemessen. Der Einfluss der Deletion des jeweiligen Transmembranrezeptors auf das radiale Wachstum war signifikant. Unabhängig

von der verwendeten Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle wuchsen die Kolonien der Deletionsmutanten nur auf 1/10 der Größe der Wildtypkolonie (Abb. 10).

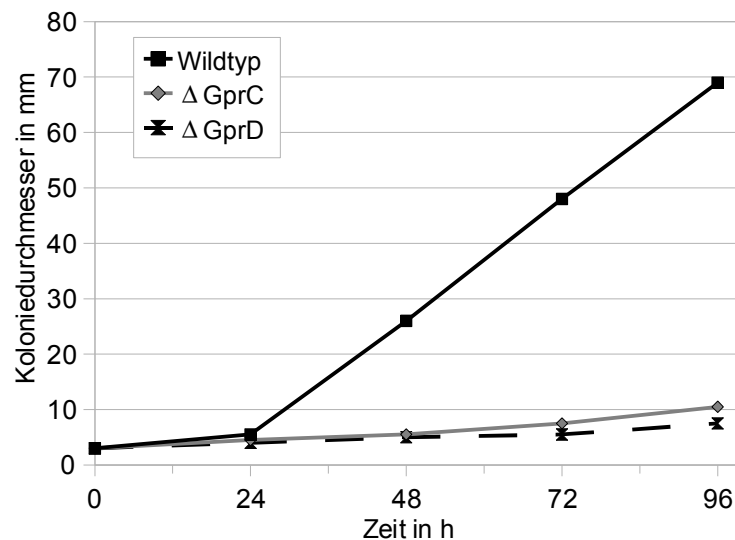


Abbildung 10: Wachstumsrate des Wildtyp und der Δ GprC und Δ GprD-Deletionsmutanten - Die Inkubation erfolgte auf Minimalmedium mit entweder 50mM Glucose oder 100mM Glycerin bei 37 bzw. 48 °C (siehe nachfolgende Tabelle). Die Werte des Wildtyps wurden gleich 100% gesetzt. Repräsentativ ist ein Diagramm zum Wachstum der Stämme auf Minimalmedium (50mM Glucose) bei 37 °C dargestellt.

	Wildtyp	Δ GprC	Δ GprD
37 °C Gluc	100%	11,9%	7,4%
48 °C Gluc	100%	0,3%	0,3%
37 °C Gly	100%	11,5%	6,7%
48 °C Gly	100%	0,3%	9,4%

Die Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate (Zunahme des Koloniedurchmesser in mm/h) ergab, dass die Hyphenextensionsrate beider Mutanten um 90% reduziert war. Der Effekt wurde deutlicher bei erhöhter Temperatur, das Wachstum betrug nicht einmal ein Prozent des Wildtyps. Eine Ausnahme bildete Δ GprD auf Minimalmedium mit 100mM Glycerin als Kohlenstoffquelle, da der Wachstumsdefekt bei erhöhter Temperatur nicht zunahm, sondern auf einem ähnlichen Niveau blieb (Abb. 10, Tabelle).

Aspergillus-Stämme, die ein langsames Wachstum und eine verzögerte Germination aufweisen, sind häufig auch in ihrer Fähigkeit zur Ausbildung von Konidien beeinträchtigt (Liebmann et al., 2004; Grosse et al., 2008). Deshalb wurde die Sporulation der Stämme

Δ GprC und Δ GprD im Vergleich zum Wildtyp bestimmt (Abb. 11). Nach mindestens dreitägiger Inkubation auf AMM-Agarplatten mit Glucose als Kohlenstoffquelle wurden die Konidien mit einer definierten Menge NaCl/Tween Lösung abgeschwemmt. Anschließend wurde die Konzentration der Sporen in einer Zählkammer bestimmt. Die Sporensuspension des Wildtyps und der Deletionsmutante Δ GprC hatten vergleichbare Titer von $1,56 \cdot 10^8$ Sporen/mL ($\pm 0,17 \cdot 10^8$) bzw. $1,32 \cdot 10^8$ Sporen/mL ($\pm 0,27 \cdot 10^8$) (Abb. 9). Abweichend davon war die Konzentration der Sporensuspension der Δ GprD-Mutante nahezu doppelt so hoch ($3,27 \cdot 10^8$ Sporen/mL; $\pm 0,56 \cdot 10^8$).

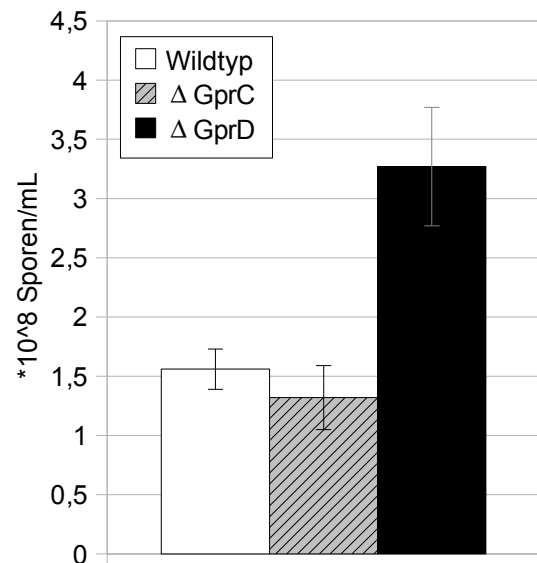


Abbildung 11: Sporulationskapazität des Wildtyp und der Δ GprC- und Δ GprD-Mutanten

Um einen weiteren Einfluss der Deletionen der beiden GPCRs, GprC und GprD, auf die Aktivität der zentralen Proteinkinasen PKA und PKC zu ermitteln, wurde mittels des „PepTag-Assay“ (Promega, Mannheim) die Aktivität im Proteinrohextrakt bestimmt. Nach Einstellen des Proteinextrakts auf 2-3 mg/mL wurden ca. 25 μ L für den Assay verwendet. Jeweils ein Ansatz erhielt zusätzlich 5 μ M cAMP, um alle verfügbaren PKA-Holoenzyme zu aktivieren und die katalytischen PKA-Untereinheiten freizusetzen. Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, war in keiner der drei Proben genug freie katalytische PKA-Untereinheiten, um phosphoryliertes Kemptid nachzuweisen. Durch die Zugabe von cAMP ließ sich das in den Extrakten vorhandene Holoenzym jedoch aktivieren (Abb. 12).

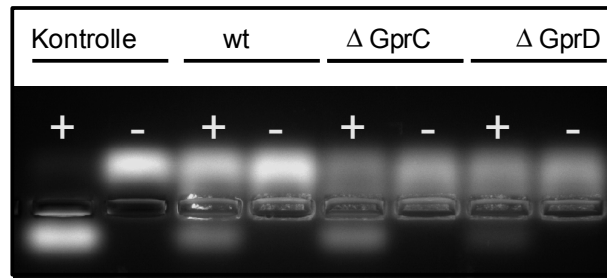


Abbildung 12: PKA-Aktivität im *A. fumigatus*-Wildtyp und den Rezeptormutanten Δ GprC und Δ GprD – Die PKA-Aktivität wurde im Proteinrohextrakt bestimmt. Phosphoryliertes Kemptid wanderte zur Anode, als Kontrolle diente PKA (Promega). Die Proben wurden mit (+) und ohne (-) cAMP inkubiert.

Auffällig war, dass bei der *gprD*-Deletionsmutante nur eine geringe Menge an phosphoryliertem Kemptid zur Anode wanderte. Daraus liess sich folgern, dass der Proteinextrakt insgesamt weniger Proteinkinase A als der Wildtypstamm und die *gprC*-Mutante beinhalten. Ein Vergleich der Aktivität der Proteinkinase C mittels des „PepTag-Assay“ brachte keine Unterschiede hervor (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Versuch wurde die drei Stämme (Wildtyp, Δ GprC und Δ GprD) auf Medien inkubiert, die mit Di-butyryl-cAMP (db-cAMP) oder Diacylglycerol (1,2-Dioctanoyl-Glycerol) (DAG) supplementiert waren. Beide dienen als intrazelluläre „second messenger“-Moleküle und aktivieren spezifisch die Proteinkinasen, PKA (db-cAMP) und PKC (DAG) in Pilzen (Liebmann et al., 2003; Thines et al., 1997). Bei einer durch die Deletionen hervorgerufenen Unterfunktion der Kinasen hätte die Zugabe der Aktivatoren ins Medium eine partielle Komplementation der Phänotypen erzielen sollen.

Sowohl die Zugabe des membrangängigen Diacylglycerol-Analogon (Abb. 13) als auch die

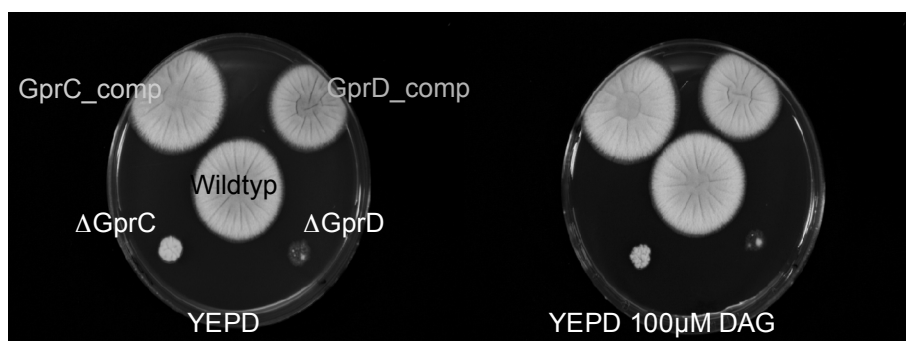


Abbildung 13: Wachstum des Wildtyps, der Deletionsmutanten und der komplementierten Mutanten – Die Teststämme wurden auf YEPD-Agarplatten mit/ohne 100 μ M DAG bei 37 °C für 40 h inkubiert.

Zugabe von db-cAMP zum Medium (Daten nicht gezeigt) führte nicht zu einer Abschwächung der beobachteten Wachstumsdefekte der Deletionsmutanten.

Somit zeigte die Bestimmung der PKA- bzw. PKC-Aktivität und die Supplementierung der Medien mit den entsprechenden Aktivatoren keinen Einfluss durch die Deletionen.

Interessanterweise wiesen aber Kolonien, die über Filtergaze steril geerntet und danach auf Agarplatten für 120 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden, einen Phänotyp auf, der im Zusammenhang mit konstitutiver PKA-Aktivität steht (Zhao et al., 2006; Grosse et al., 2008). Im direkten Vergleich zum Wildtyp fiel auf, dass die Unterseiten der Kolonien der Mutanten eine starke Pigmentierung aufwiesen (Abb. 14). Derselbe Effekt kann durch eine Überexpression der katalytischen PKA-Untereinheit erzielt werden (Grosse et al., 2008). Im peripheren Bereich der Kolonie ist die Pigmentierung deutlich weniger stark ausgeprägt.

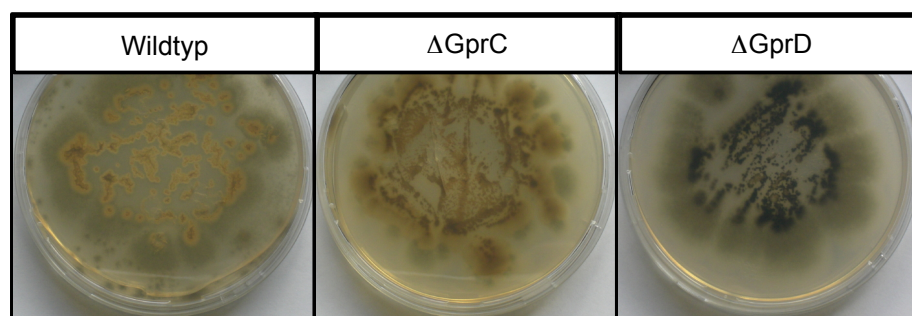


Abbildung 14: Kolonieunterseite der Teststämme - Wildtyp und *gprC/gprD*-Deletionsmutanten wurden für fünf Tage bei Raumtemperatur auf AMM-Agarplatten inkubiert.

gprC-und *gprD*-Expressionsanalyse

Um Rückschlüsse auf die Funktion der Rezeptoren während des Wachstums zu erhalten, wurde die Expression der putativen GPCRs, *gprC* und *gprD*, in Flüssigkultur und auf Festmedium untersucht. Proben wurden nach 10, 16 und 24 Stunden in Flüssigkultur und nach 6, 12 und 24 Stunden Inkubation auf Agarplatten genommen. Um ausreichende Mycelmengen von den Agarplatten zu erhalten, wurden die Proben 16 Stunden in Minimalmedium vorinkubiert, steril geerntet und anschließend auf Agarplatten ausgebracht. Als Negativkontrollen dienten die jeweiligen Deletionsmutanten, die ebenfalls nach 16 Stunden Inkubation in Flüssigmedium geerntet wurden (Abb. 15)

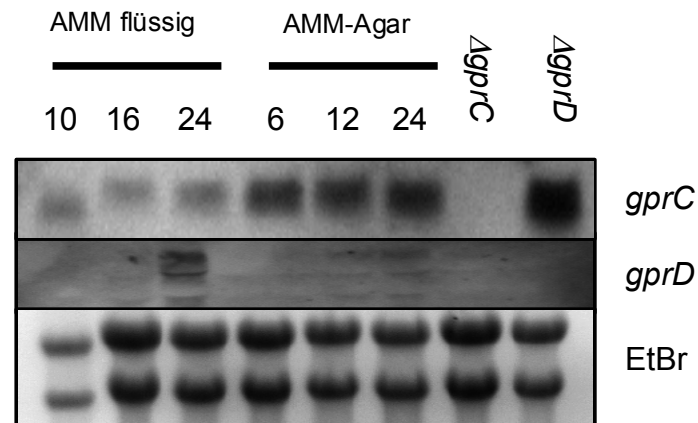


Abbildung 15: "Northern blot"-Analyse von *gprC* und *gprD* – Der Wildtypstamm CEA17 Δ akuB^{KU80} wurde für die indizierten Zeiträume bei 37 °C in AMM inkubiert. Als Kontrollen dienten die jeweilige Deletionsmutante nach 16h Inkubation in AMM. EtBr = 18S/28S rRNA-Ladekontrolle

Wie in Abb. 15 zu sehen ist, hatte die Expression von *gprC* während des vegetativen Wachstums in Flüssig- wie auch auf Festmedium ein konstantes Niveau, wobei die Transkriptmenge auf Agarplatten höher war. Die stärkste *gprC*-Expression war aber in der *gprD*-Deletionsmutante detektiert worden, so dass von einer Abhängigkeit der *gprC*-Expression von GprD ausgegangen werden kann.

Die Expressionslevel von *gprD* schienen deutlich niedriger, da das RNA-Gel mit 15 anstatt mit 10 μ g RNA beladen war, und die detektierten Signale schwächer als bei *gprC* waren. Das Maximum des Transkript war nach 24 Stunden in Flüssigkultur erreicht. Des Weiteren nahm die mRNA-Menge während der Inkubation auf Festmedium zu. Eine stärkere *gprD*-Expression in der Δ GprC-Mutante ist nicht erkennbar.

Sensitivitätsstudien der *gprC*- und *gprD*-Deletionsmutanten

Wie sich bereits in den Wachstumsstudien zeigte, wiesen die GPCR-Deletionsmutanten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Temperaturstress auf. In den folgenden Untersuchungen sollten weitere Erkenntnisse über die zelluläre Antwort auf verschiedene Stressfaktoren untersucht werden.

Eine erhöhte Inkubationstemperatur führte zu stark vermindertem Wachstum der beiden Stämme Δ GprC und Δ GprD auf Agarplatten mit Minimal- oder Vollmedium. Die Inkubation der Teststämme erfolgte für 36 Stunden. Abbildung 16 dokumentiert den Einfluss der erhöhten Temperatur von 48 °C auf das Wachstumsverhalten des Wildtyps (A/D) und der Stämme Δ GprC (B/E) und Δ GprD (C/F) auf Agarplatten. Sowohl auf Minimalmedium mit 100mM

Glycerin (A-C) als auch auf YEPD (D-F) wird die stark verlangsamte Germination der Mutanten deutlich.

Zusätzlich war bei $\Delta GprC$ (B, Ausschnitt) und $\Delta GprD$ (F) zu erkennen, dass die beobachtete Kompaktheit der Kolonien auf die starke Verzweigung der Hyphen („hyper branching“) zurückzuführen ist. Gorovits und Yarden (2003) beobachteten, dass in der *N. crassa cot-1*-Mutante, die ebenfalls einen ausgeprägten „hyper branching“-Phänotyp besitzt, durch das Induzieren von Stress der Phänotyp supprimiert werden konnte.

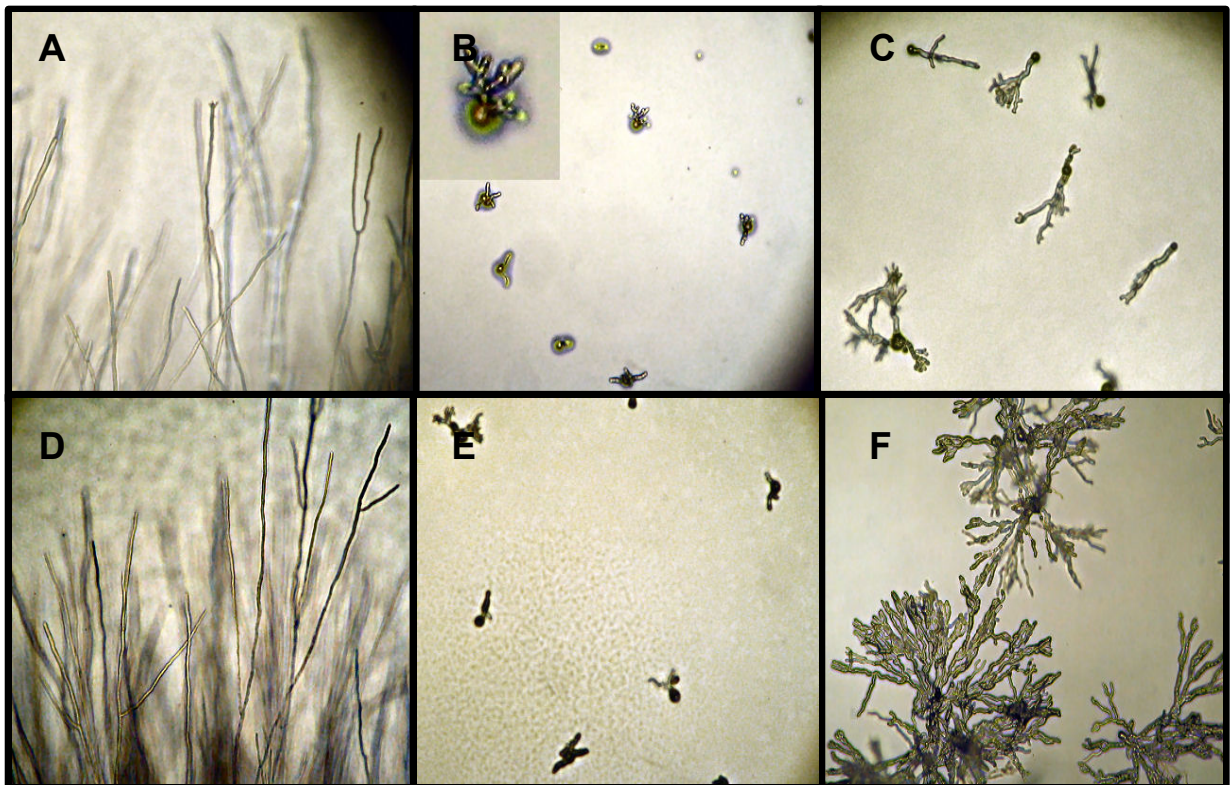


Abbildung 16: Mikroskopische Aufnahmen des Wildtyp und der Stämme GprC und GprD auf Agarplatte – der Wildtyp (A+D) und die Deletionsmutanten $\Delta GprC$ (B+E) und $\Delta GprD$ (C+F) wurden bei 48 °C auf AMM mit 100mM Glycerin als C-Quelle (A-C) oder YEPD (D-F) für 36 h inkubiert. Die Angabe eines Größenstandards war bei diesen Aufnahmen nicht möglich, da sie mit einem inversen Mikroskop (10-fach Objektiv) und einer Digitalkamera erstellt wurden.

Die Zugabe der Stresinduktoren 1M Sorbitol, 0,9M NaCl oder 7,5% (v/v) Ethanol zum Medium führte im Fall der *gprD*- und *gprC*-Deletionsmutanten jedoch nicht zu einer Abschwächung des „hyper-branching“-Phänotyps (Daten nicht gezeigt).

Die Sensitivität der Stämme gegenüber verschiedenen Stressfaktoren wurde auch in Flüssigmedium getestet. Hierzu wurden die Sporen bei 45 °C über Nacht in AMM inkubiert.

In einem weiteren Versuchsansatz sollte die Reaktion der Stämme nach einem Temperaturwechsel von 30 auf 48 °C untersucht werden. Die Adaptionsmechanismen der Deletionsmutanten waren in dem Temperaturshift-Experiment aber nicht ausreichend, da nach einer Stunde bereits ein Großteil der Hyphen lysiert war (Daten nicht gezeigt).

Die Inkubation bei 45 °C ergab folgendes Bild (Abb. 17): der Wildtyp (A/C) war im Vergleich zu den Stämmen Δ GprC (B/E) und Δ GprD (C/F) normal ausgekeimt und auch die Hyphenstruktur ließ keine Defekte erkennen. Die 45 h-Probe (D-F) wies im Gegensatz zur 13 h-Probe (A-C) lediglich eine stärkere Vakuolisierung auf, was auf einen allgemeinen Stresszustand schließen lässt.

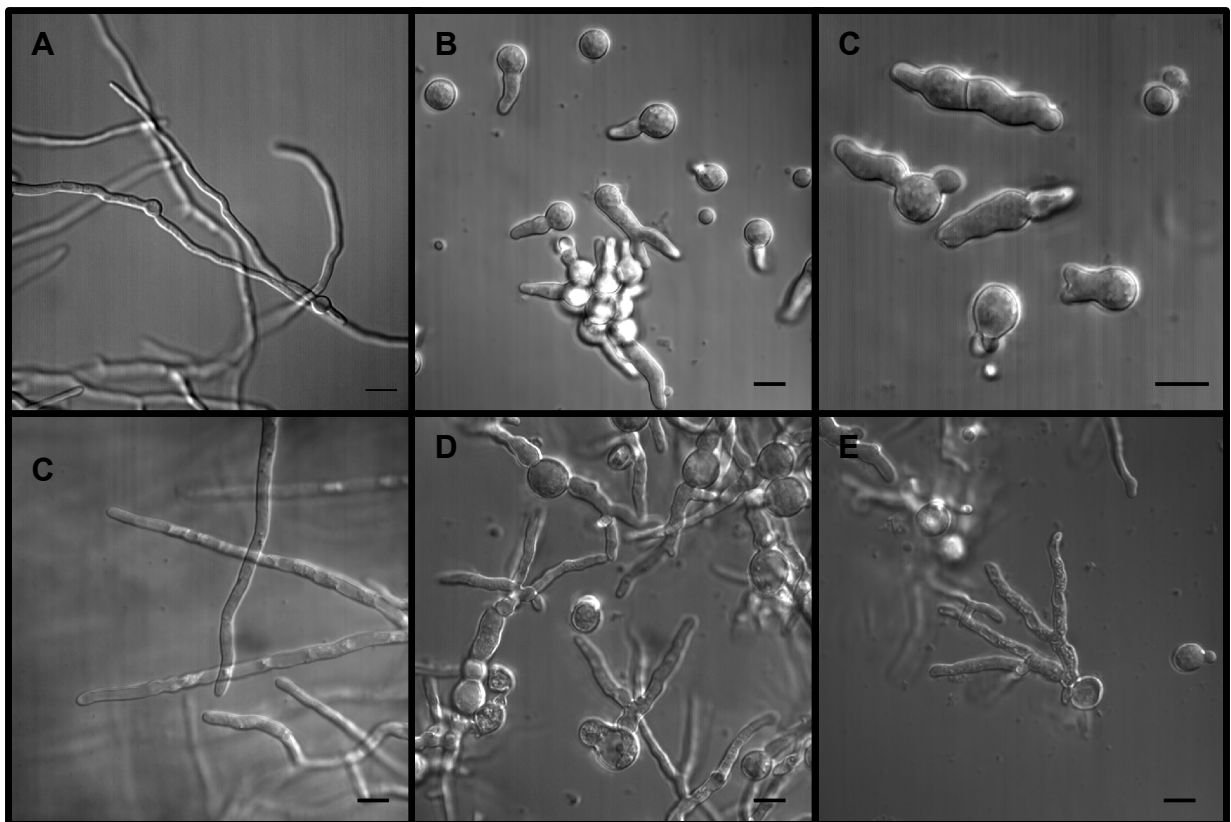


Abbildung 17: Mikroskopische Aufnahmen des Wildtyps und der Stämme Δ GprC und Δ GprD in Flüssigmedium – der Wildtyp (A+D) und die Deletionsmutanten Δ GprC (B+E) und Δ GprD (C+F) wurden bei 48 °C in AMM mit für 13 h (A-C) resp. 45 h (D-F) inkubiert. Maßstab = 10 μ m

vergleichbar. Die Sporen und Hyphen schienen im Vergleich zum Wildtyp etwas dicker und waren häufiger verzweigt. Die Temperatur von 45 °C führte hier allerdings dazu, dass einige Hyphen und geschwollene Sporen der Mutanten nach 45 h Inkubation bereits lysierten (E/F), wohingegen die Hyphen des Wildtyp nur eine stärkere Vakuolisierung aufwiesen.

Um den Einfluss weiterer Umweltfaktoren zu untersuchen, wurden die zu testenden Stämme in einem Plattendiffusions-Assay verschiedenen Substanzen ausgesetzt, welche Stress durch die Produktion reaktive Sauerstoffspezies (ROS) auslösen. In eine Agarschicht mit definierter Sporenkonzentration wurde nach dem Erhärten ein Loch gestanzt, in welches 150µL der zu testenden Substanz gegeben wurde. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C konnte durch direkten Vergleich der Hemmhöfe eine Aussage über die relative Sensitivität der Stämme gemacht werden (Abb. 18). Die eingesetzten Chemikalien waren Wasserstoffperoxid (3%), welches die intrazelluläre Konzentration an Peroxidationen (O_2^{2-}), und Menadion (8mM), welches die Superoxidanionenkonzentration (O_2^-) erhöht. Diamid (200mM) ist ein oxidatives Agens, das unspezifisch Thiolgruppen von Proteinen innerhalb der Zelle oxidiert. Außerdem stört es das Redoxgleichgewicht der Pilzzelle, da es den Redoxregulator Glutathion oxidiert (Thön et al., 2007).

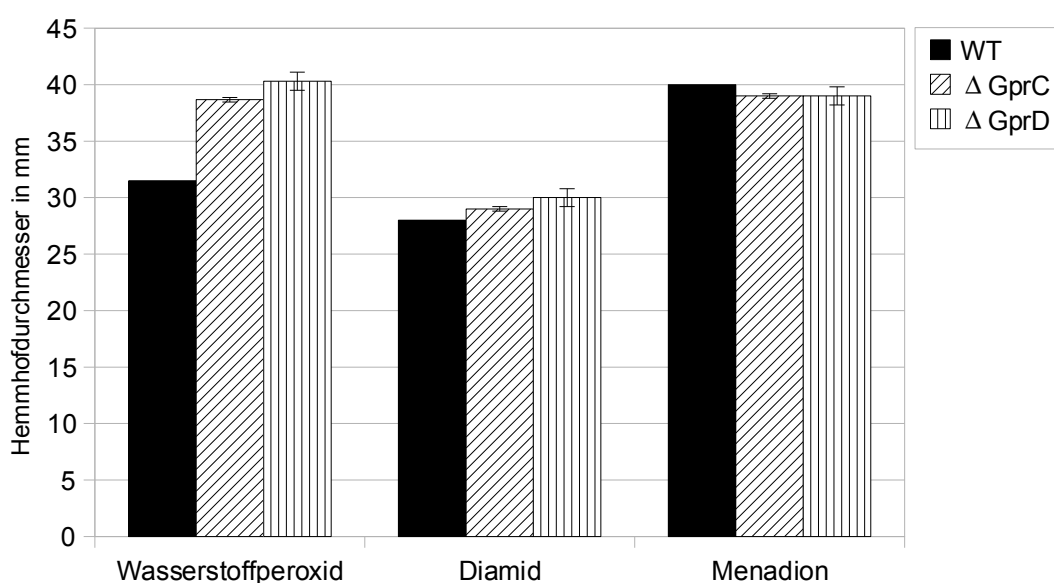


Abbildung 18: Sensitivität der Teststämme gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies – die Sensitivität des Wildtyps und der Stämme $\Delta GprC$ und $\Delta GprD$ gegenüber reaktiven Sauerstoffintermediaten wurde in einem Plattendiffusions-Assay untersucht. 3% (v/v) H_2O_2 , 0,2M Diamid und 8mM Menadion wurden als Testagentien im Assay verwendet.

Die Sensitivität der Stämme $\Delta GprC$ und $\Delta GprD$ gegen ROI war nur im Ansatz mit Wasserstoffperoxid erhöht. Der Hemmhof der *gprC*-Deletionsmutante war ca. 21%, der der *gprD*-Deletionsmutante ca. 25% größer. Die Ansätze mit Diamid und Menadion zeigten keine signifikanten Unterschiede. Somit hatten die Deletionen der Transmembranrezeptoren nur Einfluss auf die Suszeptibilität der Mutante auf das toxische Agens Wasserstoffperoxid. Die

beobachten, da sowohl die *gprC*-Mutante (Abb. 19, untere Reihe), als auch die *gprD*-Mutante (Abb. 19, obere Reihe) bei Raumtemperatur weniger empfänglich für die Chemikalien sind. Erneut wurde bei diesem Versuchsaufbau deutlich, dass das Wachstum des Stammes Δ GprD stärker Temperatur-abhängig als das der GprC-Mutante ist.

Ein weiterer externer Faktor, der oxidativen Stress verursachen kann, ist die Präsenz von Schwermetallen im Medium. Um den Einfluss von ausgewählten Schwermetallen zu untersuchen, wurden Sporensuspensionen des Wildtyps und der Deletionsmutanten Δ GprC und Δ GprD auf Agarplatten mit AMM supplementiert mit den jeweiligen Schwermetallen aufgetropft (Abb. 20). Um Temperatureffekte zu minimieren, wurden die Agarplatten bei Raumtemperatur (20 °C) für fünf Tage inkubiert. Wie in Abbildung 18 zu erkennen ist, hatten Schwermetalle im Medium keine Auswirkungen auf das Wachstum der Stämme. Einzig die Supplementierung mit Blei-(V)-Acetat führte zu einer Reduktion des Wachstum und der Sporulation beider Deletionsmutanten (Abb. 20C).

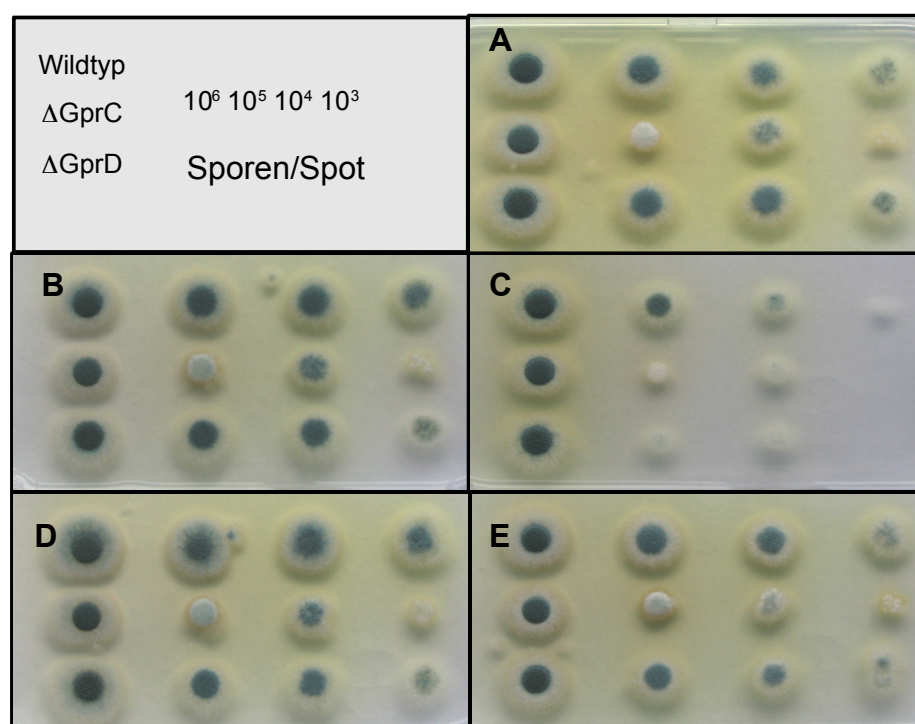


Abbildung 20: Verdünnungsreihe des Wildtyps und der Stämme Δ GprC und Δ GprD
– Inkubation erfolgte für 5 Tage bei 20 °C auf AMM mit folgenden Supplementen: (A) 200mM Kobalt(II)chlorid, (B) 200mM Zink(II)chlorid, (C) 200mM Blei(V)acetat, (D) 200mM Nickel(II)sulfat, (E) 200mM Kupfer(II)sulfat

Expressionsanalysen der Stressantwort

Um die zelluläre Antwort auf externen Stress näher zu untersuchen, wurden „Northern blot“-

Analysen durchgeführt. In den Arbeiten von Lessing et al. (2007) und Lamarre et al. (2007) wurden die beiden Proteine AfYAP1 und AfSKN7 als zentrale Regulatoren der zellulären Antwort bei ROS-Stress identifiziert. Die Sonden waren gegen die allgemeinen Stressregulatoren *yap1* und *skn7* und deren Zielgene gerichtet.

Die Kulturen wurden in 100mL AMM für 18 Stunden inkubiert und ROS-Stress wurde mit 2mM Wasserstoffperoxid induziert. Nach 15, 30 und 50 Minuten wurden Proben entnommen, als Kontrolle diente Zeitpunkt T₀.

AspF3 kodiert für eine Thioredoxinperoxidase, *pnr1* für die *p*-Nitroreduktase und *cat2* für die bifunktionale, myceliale Katalase in *A. fumigatus*. Diese drei Enzyme sind an der Detoxifizierung von H₂O₂ beteiligt und als Zielgene von AfYAP1/SKN7 identifiziert worden (Lessing et al., 2007). In Abbildung 21 ist der Transkriptlevel der einzelnen Gene in Antwort auf die Induktion von ROS-Stress dokumentiert.

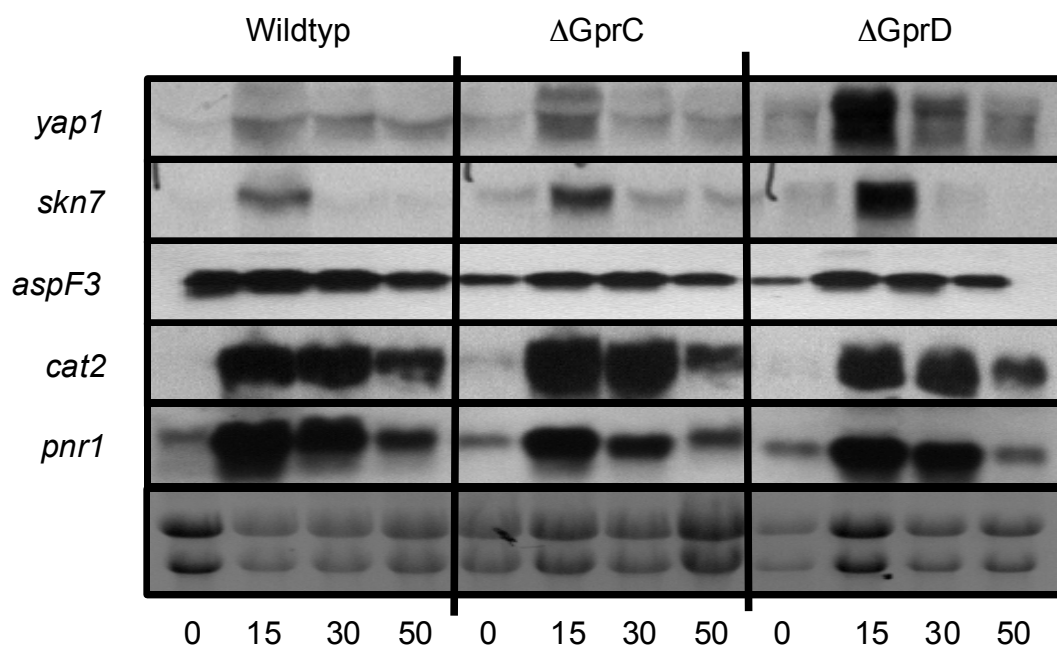


Abbildung 21: „Northern Blot“-Analyse der ROS-Stressantwort in den Teststämmen – Der Wildtyp und die Stämme Δ GprC und Δ GprD wurden über Nacht in AMM inkubiert und zum Zeitpunkt T₀ mit 2mM H₂O₂ gestresst. Der Transkriptionsverlauf ausgewählter Gene wird gezeigt. Als Ladekontrolle diente Ethidiumbromid-gefärbte 18S/28S rRNA.

In beiden Deletionsmutanten sind die Transkriptionsfaktoren *Afyap1* und *skn7* stärker im Verlauf des Experiments induziert als im Wildtyp (Abb. 21). Dennoch sind die Signale für die Zielgene der oxidativen Stressantwort auf einem ähnlichen Niveau, so dass eine alleinige

Regulation von z.B. *aspF3* oder *cat2* durch AfYAP1 und SKN7 unwahrscheinlich ist.

Hitzestress-Antwort in *A. fumigatus*

Die *gprC*-/ *gprD*-Deletionsmutanten zeigten eine erhöhte Sensitivität der Stämme gegenüber hohen Temperaturen, weshalb die zelluläre Antwort auf Hitzestress untersucht werden sollte. Die zu testenden Stämme wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zwei Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Kulturen bei 30 °C weiter geschüttelt und danach, um den Hitzeschock zu induzieren, in ein 45 °C heißes Wasserbad umgesetzt. Die Proben wurden nach 15, 30 und 50 Minuten geerntet, als Kontrolle diente Zeitpunkt T₀.

Im „Northern blot“ wurden die „response regulators“ *Afyap1*, *skn7* und zwei weitere Gene, *hsf1*, ein Hitzeschock-induzierter Transkriptionsfaktor, und *cat2*, die bifunktionale Katalase, untersucht (Abb. 22). Der Transkriptionsfaktor HSF1 reguliert nicht nur die zelluläre Antwort auf Hitzeschock, sondern wurde in Hefe auch mit der Antwort auf oxidativen Stress (Yamamoto et al., 2007) und der Aufrechterhaltung der Zellwandintegrität (Truman et al., 2007) in Verbindung gebracht.

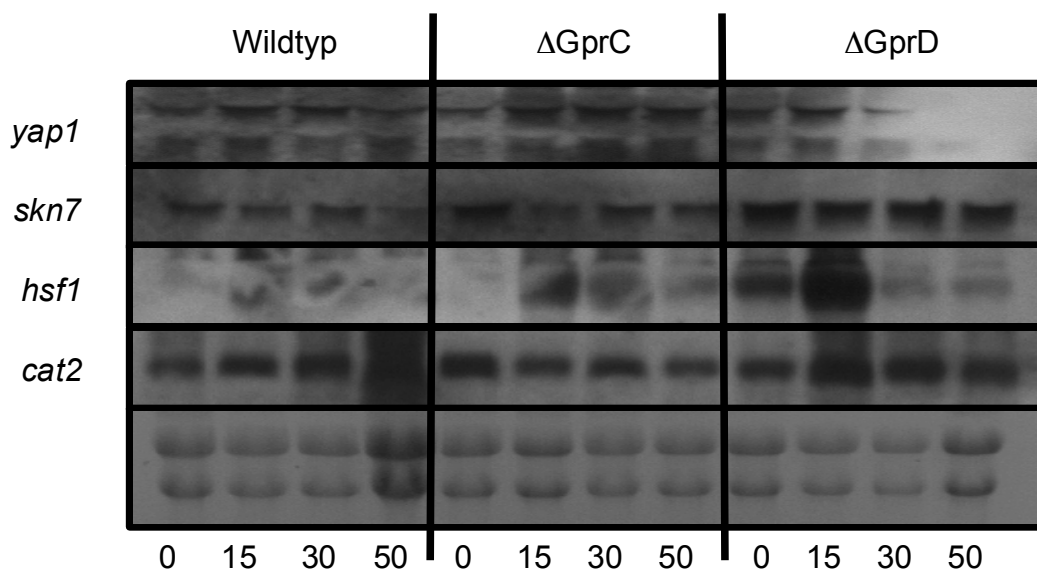


Abbildung 22: „Northern blot“-Analyse der Hitzestress-Antwort im Wildtyp und den Stämmen ΔGprC und ΔGprD - Die Inkubation erfolgte für 18 h bei 37 °C, danach für 2 h bei 30 ° und für die angegebenen Zeiträume bei 45 °C. Proben wurden nach 15, 30 und 50 Minuten genommen. Als Ladekontrolle diente Ethidiumbromid-gefärbte 18S/28S rRNA.

Das Transkriptniveau von *Afyap1* und *skn7* blieb nahezu unverändert, wobei die Expression

von *Afyap1* in den getesteten Stämmen eine leichte Steigerung nach 15 und 30 Minuten aufwies. Die Expression von *hsf1* erreichte in allen Proben das Maximum nach 15 Minuten, fiel aber bereits nach 30 Minuten wieder auf Ausgangsniveau zurück, wobei die Induktion in der *gprD*-Deletionsmutante am stärksten war (Abb. 22). Dies deckte sich mit der Beobachtung, dass die Mutante empfindlicher auf erhöhte Temperatur als der Stamm Δ GprC reagierte.

eGFP-Lokalisationsstudien

Um einen Nachweis für die zelluläre Lokalisation führen zu können, wurden Reportergenfusionen mit Fluoreszenzproteinen (eGFP, dsRed) konstruiert. Hierzu wurden die jeweiligen ORFs (*gprC* und *gprD*) unter Kontrolle des nativen oder eines konstitutiv aktiven Promotors gestellt. So konnte das Lokalisationsverhalten der Rezeptoren unter verschiedenen Inkubationsbedingungen näher untersucht werden, um z.B. in Erfahrung zu bringen, welcher externe Stimulus zu einer Internalisierung des Rezeptors führt. In dem Meningitis-Erreger *Cryptococcus neoformans* fusionierten Xue et al. (2005) einen putativen GPCR (Gpr-4) mit dem rot-fluoreszierenden DsRed und konnten mit Hilfe von Lokalisationsstudien bestimmte Aminosäuren als Liganden des membranständigen Rezeptors identifizieren.

Mit Hilfe einer „proof-reading“-Polymerase wurden die kodierenden Bereiche von *gprC* und *gprD* per PCR amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass sie flankierende *Bam*HI-Schnittstellen trugen und eine direkte Klonierung in den p123-Vektor (Spellig et al., 1996) erlaubten. Der Vektor kodiert für das eGFP („enhanced green fluorescent protein“), welches eine mutierte (Serin zu Threonin an Pos. 65) Variante des natürlichen Fluoreszenzproteins enthält. Die Expression steht unter Kontrolle des konstitutiven *otef*-Promotors aus *Ustilago maydis* (Spellig et al., 1996). Als Selektionsmarker diente das *hph*-Gen, das für eine Hygromycinphosphotransferase kodiert und Resistenz gegenüber dem Aminoglykosid Hygromycin verleiht.

Um die Rezeptor-eGFP-Fusion unter Kontrolle des nativen Promotors zu stellen, wurden Restriktionsenzyme gewählt, die jeweils nur einmal und nahe des C-Terminus der Rezeptoren schnitten. Da beide Proteine einen mehrere Dutzend Aminosäuren-langen intrazellulären Peptidrest besitzen, sollte eine C-terminale Fusion mit eGFP die Lokalisation nicht beeinträchtigen. So wurden die kodierenden und flankierenden Bereiche von *gprC* und *gprD*

mittels „proof-reading“-Polymerase amplifiziert und subkloniert. Die ebenfalls per PCR mit den jeweiligen Schnittstellen versehenen *eGFP*-Fragmenten konnten mittels spezifischer Restriktionsschnittstellen (*gprC* = *NsiI*; *gprD* = *NdeI*) in die Zielvektoren kloniert werden. Alle Übergänge innerhalb der Konstrukte und die kodierenden Bereiche wurden per Sequenzierung auf Korrektheit überprüft.

Die Expression einer Reportergenfusion war nur für GprC-eGFP erfolgreich. Mit keinem der verwendeten Konstrukte, unabhängig vom Promotor (nativ oder konstitutiv), konnte Fluoreszenz für eine Fusion von eGFP mit GprD nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde eine Fusion von GprD mit dem rot fluoreszierenden dsRed2-Protein kloniert. Mit diesem Konstrukt war ebenfalls keine Fluoreszenz nach Transformation von *A. fumigatus* nachweisbar. Um eine mögliche Proteinfehlfaltung und einen damit verbundenen Abbau des Proteins zu vermeiden, erfolgte die Klonierung des eGFP/dsRed2 an verschiedene Positionen innerhalb der Sequenz des C-Terminus von GprD, wobei aber keiner der verfolgten Ansätze zum Ziel führte. Somit wurden die nachfolgende Untersuchungen nur mit der GprC-eGFP-Fusion vorgenommen.

Der *A. fumigatus* Stamm ATCC 46645 wurde mit den Plasmiden natGprC-eGFP (nativ) und p123GprC (konstitutiver Promotor) transformiert. Putative Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR auf Integration von *eGFP* durchmustert. Transformanten mit positivem PCR-Signal wurden über Nacht in AMM inkubiert und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Als Gegenfärbung diente Calcofluor White, welches die Zellwand von Ascomyceten färbt, da es an Chitin-haltige Strukturen bindet. Die anschließende Untersuchung der Mutanten wurde an einem konfokalen Mikroskop der Firma Carl Zeiss (LSM 5 Live) vorgenommen.

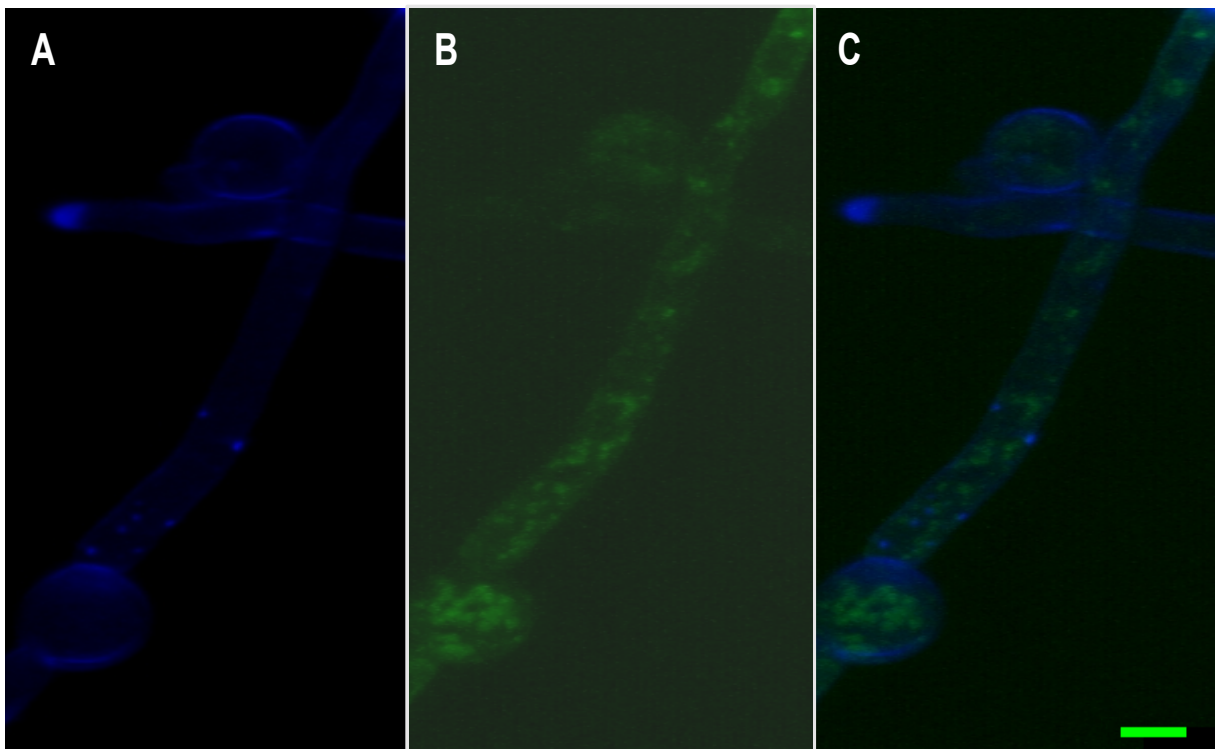


Abbildung 23: Expression des *gprC-eGFP*-Konstruktes und Lokalisierung der Proteinfusion-Das GPRC-eGFP Fusionsprotein (B) wurde in 18h alten Keimlingen und Hyphen mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Eine Chitinfärbung mit Calcofluor (A) diente als Gegenfärbung. Die Überlagerung ist in (C) zu sehen (Maßstab = 10µm).

Die Lokalisation des GprC-eGFP-Konstruktes war deutlich unter den Inkubationsbedingungen (18 h, 37 °C in AMM 50mM Glucose) zu detektieren (Abb. 23). Die Fluoreszenz war in der Membran lokalisiert, wobei aber ein Gradient zu erkennen war, da die Intensität von dem älteren Teil der Hyphe hin zur Spitze zunahm. So erschien im Bereich unterhalb der Hyphenspitze, ein Bereich mit hoher Vesikelaktivität aufgrund der Zellwandsynthese, das Fusionsprotein am stärksten konzentriert. Somit korrelierte die eGFP-Fluoreszenz mit der an den Hyphenenden starken Calcofluor White-Färbung.

Dahingegen unterlag das GprC-eGFP-Konstrukt im älteren Teil der Hyphe einer geringeren Transportaktivität und war zunehmend in Vakuolen-artigen Strukturen zu finden. Um die Lokalisation in der Vakuole nachzuweisen, wurden die Kulturen mit dem membran-affinen Styryl-Farbstoff FM4-64 (*N*-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino)-phenyl)-hexatrienyl)-pyridinium- Dibromid) gefärbt (Abb. 24).

Für die Verteilung der eGFP-Fluoreszenz ergab sich wieder, dass die Intensität an den Hyphenspitzen und in der umgebenden Membran stärker war als in den älteren Teilen der Hyphe. Die Gegenfärbung mit FM4-64 zeigte nach 15-20 Minuten Inkubation folgende Verteilung: der Farbstoff war über Endozytose-artige Prozesse aufgenommen worden und war in den Membranen von Vesikeln verschiedener Größe im Zytoplasma sichtbar. Da nicht das Lumen, sondern nur die Membran durch FM4-64 rot gefärbt wird, konnten eindeutig Rezeptor-eGFP-Fusionen in der Vakuole lokalisiert werden (weiße Pfeile).

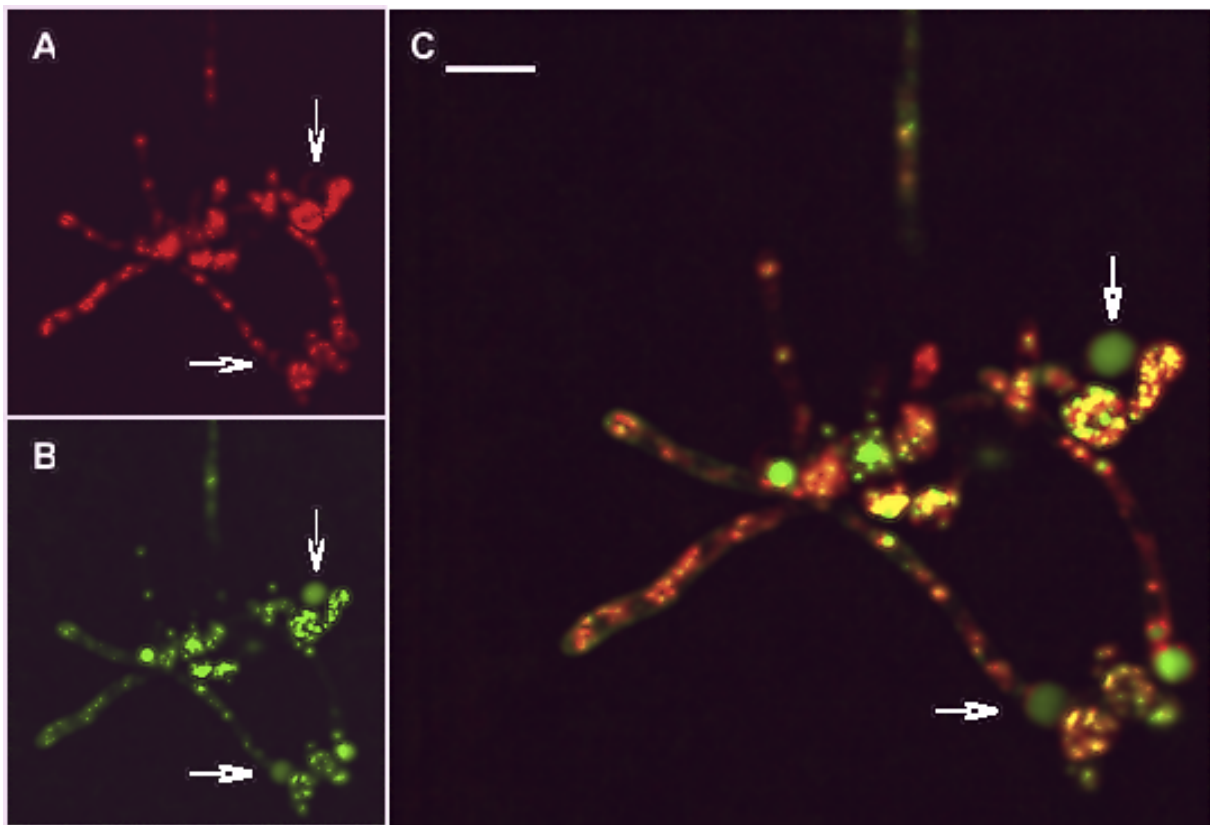


Abbildung 24: Expression des *gprC-eGFP*-Konstruktes und Lokalisierung der Protein-fusion-Die eGFP-Fusion (B) wurde in 18h alten Keimlingen und Hyphen auf Vakuolenlokalisierung untersucht. Als Gegenfärbung wurde FM4-64 verwendet (A). Bild (C) zeigt eine Überlagerung. Die Pfeile weisen auf GprC-eGFP-Fluoreszenz in den Vakuolen hin (Maßstab = 10µm).

Die Internalisierung des Rezeptors und der anschließende Transport zur Vakuole muss ein gerichteter Prozess sein, da es keine gleichmäßige Verteilung der GprC-eGFP-Fusionsproteine über alle zellulären Vakuolen gab (Abb. 24).

Bei genauerer Betrachtung konnte die eGFP-Fluoreszenz auch auf beiden Seiten des Septums nachgewiesen werden (Abb. 25). Das GprC-eGFP-Protein konnte sogar bei sich neu bildenden Septen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

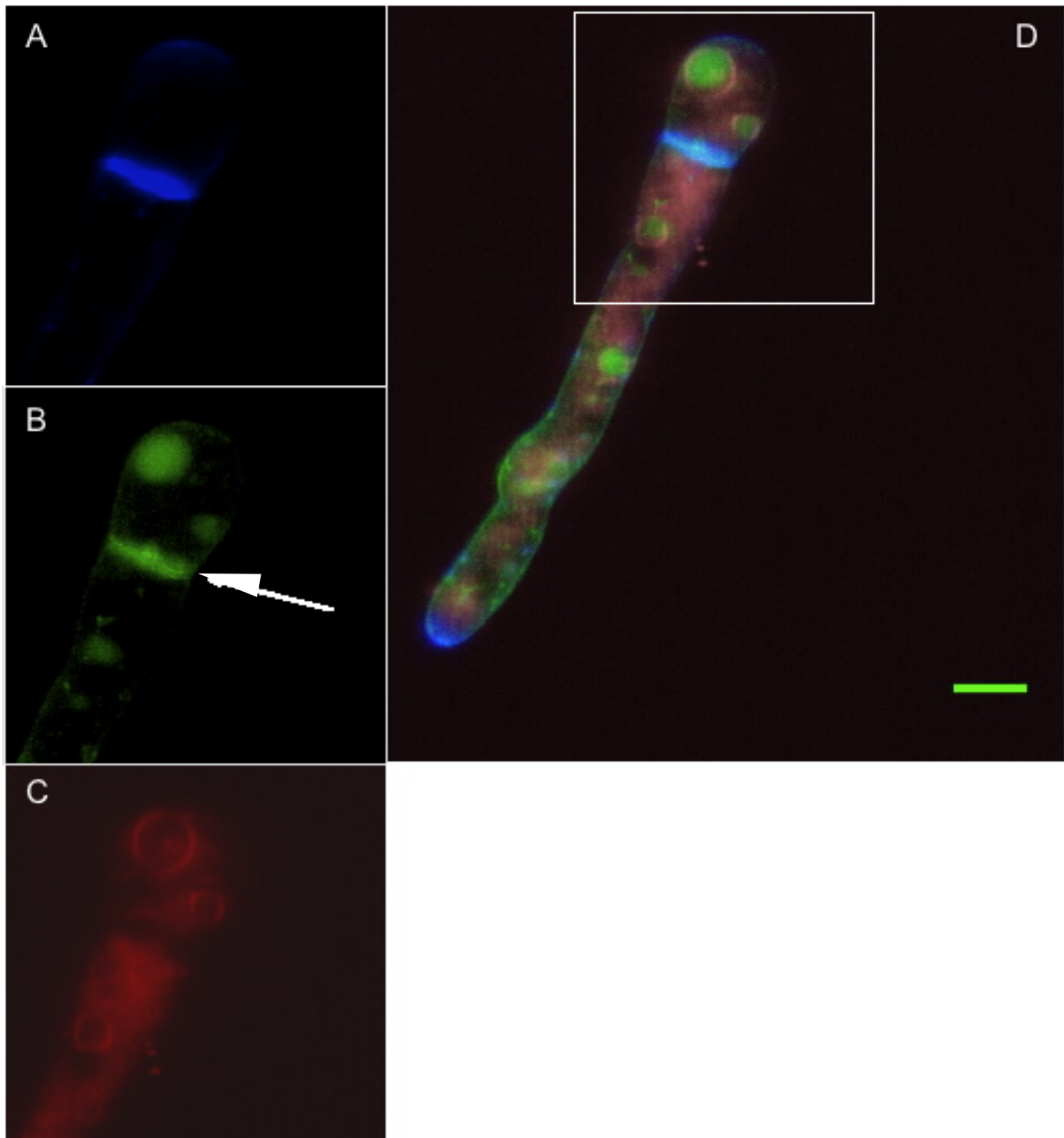


Abbildung 25: Fluoreszenzaufnahme einer auskeimenden Spore – Das Präparat wurde mit Calcofluor (A) und FM4-64 (C) gefärbt – (B) zeigt die eGFP-Fluoreszenz des Fusionproteins und (D) die Überlagerung der drei Fluoreszenzbilder (Maßstab = 5µm).

Virulenzstudien mit *gprC*-/*gprD*-Deletionsmutanten

Der Effekt der Deletion der beiden Rezeptoren auf die Virulenz wurde in einem murinen Inhalationsmodell nach Liebmann (2004) getestet. Hierbei wird die Bildung von Zellen des Immunsystems der Versuchstiere pharmakologisch gehemmt, um die Situation des immunsupprimierten Patienten nachzuahmen. Die Applikation von Cortisonacetat und Cyclophosphamid führt zu einer Reduktion der Anzahl der neutrophilen Granulozyten, Leukopenie, und reduzierter Makrophagenaktivität. Somit wird die erste Barriere des Immunsystems in der Lunge in ihrer Aktivität stark reduziert, so dass sich eine Infektion etablieren kann. Die intranasale Applikation der $3 \cdot 10^4$ Sporen/Versuchstier erfolgte unter Narkose, damit die Tiere die Sporensuspension nicht verschlucken. Jegliche Beeinträchtigung des Verhaltens oder Aussehens (ungepflegtes Fell, verminderte Körperoberflächentemperatur, Apathie, Gleichgewichtsstörungen) eines Versuchstieres hatte eine besondere Beobachtung zur Folge, so dass bei schwerwiegenden Symptomen das entsprechende Versuchstier aus Tierschutzgründen eingeschläfert wurde.

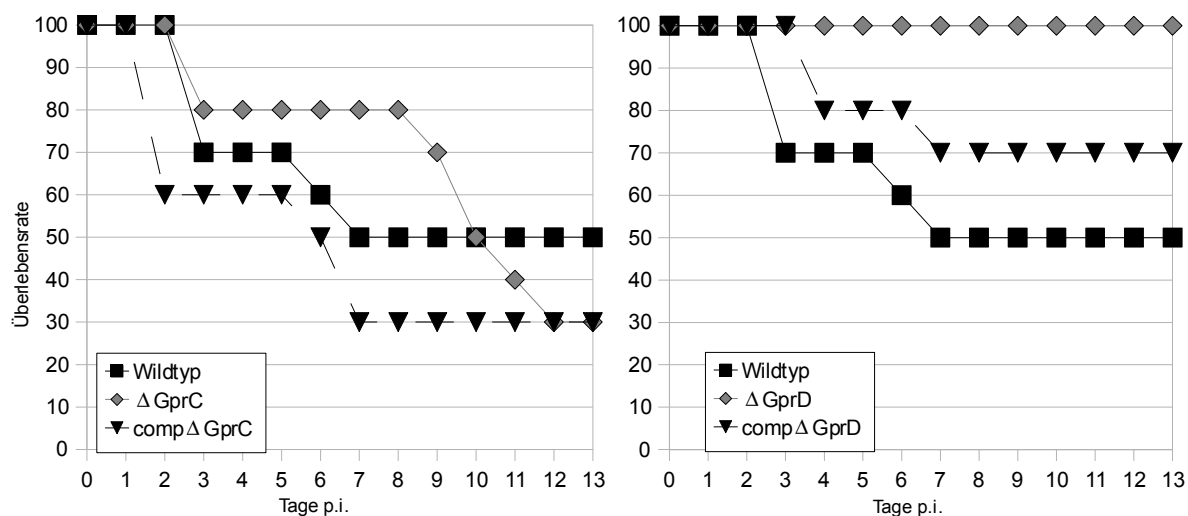


Abbildung 26: *A. fumigatus* Virulenzstudie im panleukopenischen Mausmodell – Der *A. fumigatus* Wildtyp, die *gprC*-/*gprD*-Deletionsmutanten und die zugehörigen Komplementationsstämme wurden zur Infektion von weiblichen Balb/C-Mäusen, die mit Cortisonacetat und Cyclophosphamid immunsupprimiert waren, eingesetzt.

In der Infektionsstudie (Abb. 26) waren beide Deletionsmutanten in ihrer Virulenz reduziert. Die Infektion mit der *gprC*-Mutante führte zwar am Ende des Versuchszeitraumes zu einer 30%igen Überlebensrate der Versuchstiere, dafür ist aber der Krankheitsverlauf im Vergleich zum Wildtyp und der zugehörigen Komplementation deutlich verzögert (50% Survival nach 6/7 Tagen gegenüber 10 Tagen bei der Mutante). Die Versuchsgruppe, die mit der *gprD*-

Mutante infiziert war, hatte zwar schwache Krankheitssymptome, überlebte aber komplett. Einschränkung ist zu vermerken, dass der Wildtyp in dieser Studie keine volle Virulenz zeigte.

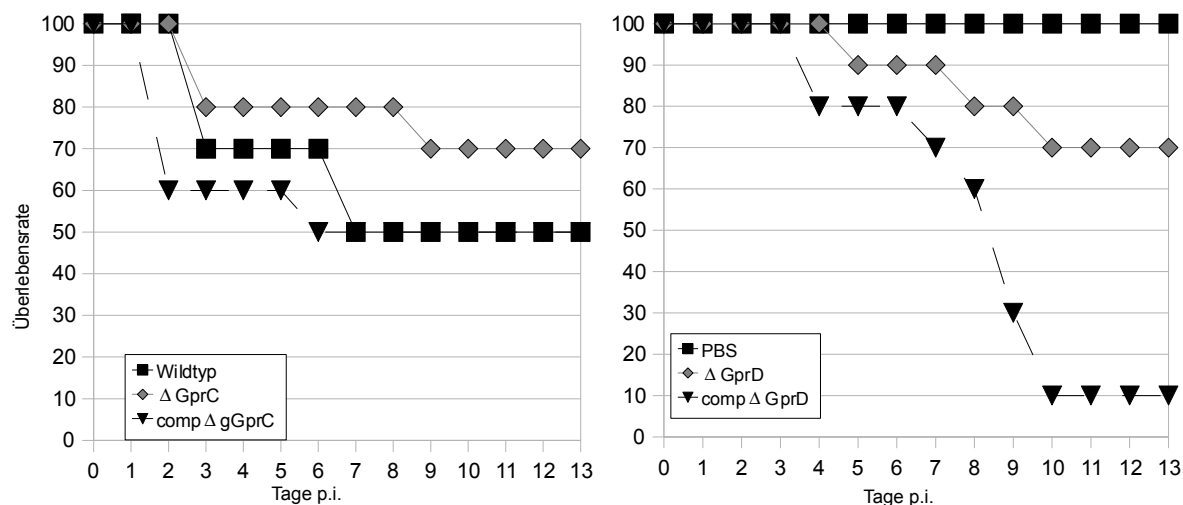


Abbildung 27: *A. fumigatus* Virulenzstudie im panleukopenischen Mausmodell – Der *A. fumigatus* Wildtyp, die *gprC*-/ *gprD*-Deletionsmutanten und die zugehörigen Komplementationsstämme wurden zur Infektion von weiblichen Balb/C-Mäusen, die mit Cortisonacetat und Cyclophosphamid immunsupprimiert waren, eingesetzt.

In einer zweiten Infektionsstudie erfolgte die Immunsuppression durch eine einmalige subkutane Applikation von Cortisonacetat (200 mg/kg Körpergewicht) an Tag -1 und mit Cyclophosphamid (120 mg/kg Körpergewicht) an den Tagen -4/-1/2/5/8/11 bezogen auf den Tag der Infektion (Abb. 27).

Die zweite Infektionsstudie brachte ein vergleichbares Ergebnis hervor. Die Deletion von *gprC* führte nur zu einer leichten Attenuation der Virulenz, was sich in der geringfügig höheren Überlebensrate der Versuchstiere und einem verzögerten Krankheitsverlauf äußerte. Die *gprD*-Deletion war zwar nicht avirulent, hatte aber im direkten Vergleich zur *GprD*-Komplementation eine signifikant höhere Überlebensrate.

Um den klinischen Verlauf der Infektion besser darzustellen, wurde als weiterer Parameter die Diagnose von Dyspnoe herangezogen. Im Falle einer sich etablierenden Infektion der Mauslunge durch *A. fumigatus* nimmt in deren Folge durch Zerstörung des Lungengewebes und inflammatorischer Reaktionen die Vitalkapazität der Lunge ab, so dass es zu einer Sauerstoffunterversorgung des Organismus kommt. Eine Dyspnoe kann verschiedene Schweregrade erreichen, die von einfachem Hecheln bis hin zur Schnappatmung von aufrecht sitzenden Tieren reichen kann (pers. Mitteilung I. Jacobsen, S. Slesiona).

In Abbildung 28 ist der Verlauf der Tiere, die eine Dyspnoe aufwiesen (unabhängig vom

Ausprägungsgrad), dargestellt, wobei Versuchstiere, die verstarben weiterhin als Dyspnoe-positiv gerechnet wurden. Der Verlauf der Kurven zeigt ein Bild, welches die Überlebensrate der Versuchstiere widerspiegelt. Am deutlichsten hebt sich wieder die Versuchsgruppe ab, die mit der *gprD*-Komplementation infiziert wurde, da nach sechs Tagen der gesamten Gruppe Dyspnoe attestiert werden konnte. Der Wildtyp und die *gprC*-Komplementation offenbarten einen vergleichbaren Kurvenverlauf, der sich durch einen etwas weniger starken Anstieg am Versuchsbeginn auszeichnete und danach auf etwas niedrigerem Niveau als die *gprD*-Komplementation verblieb.

Die Stämme Δ GprC und Δ GprD verursachten im Vergleich zum Wildtyp einen deutlich abgeschwächten Krankheitsverlauf. Die klinischen Symptome der Dyspnoe wurden bei den Versuchstieren, die mit den Deletionsmutanten infiziert wurden, erst nach fünf bis sechs Tagen sichtbar und die gesamte Infektion verlief langsamer und weniger ausgeprägt als bei den mit den komplementierten Mutanten und dem Wildtyp infizierten Versuchstieren (Abb. 26).

Um eine weitere Bewertung des Infektionsverlaufs zu ermöglichen, wurden verstorbenen oder eingeschläferten Versuchstieren die Lungen entnommen und für eine spätere histologische Aufbereitung in Formalin gelagert. Für die Histopathologie wurden die Lungen mit dem Mikrotom geschnitten und mit Hämatoxylin/Eosin (Gewebe) und mit Methenamin-Silber nach Gomori-Grocott (Pilz) gefärbt. Da bei der Auswertung nur wenig Mycel gefunden wurde, wurde auf die krankhaften Veränderungen der Lungenschnitte besonderes Augenmerk gelegt, wobei nekrotische Bereiche durchaus noch Mycel enthalten konnten, dies aber nur schwer totem Gewebe zu differenzieren war (pers. Mitteilung I. Jacobsen).

Die Lungen der beiden am Versuchsende eingeschläferten Tiere der PBS-Kontroll-Gruppe waren ohne besonderen Befund (alles pers. Mitteilung I. Jacobsen).

Aus der Versuchsgruppe, die mit dem Wildtyp infiziert wurde, wurden vier Lungen näher untersucht. Alle vier Lungen wiesen infolge der Infektion hyperämische Bereiche und lokale Blutungen auf, es konnte aber kein Mycel nachgewiesen werden.

In den untersuchten Lungenschnitten der vier Versuchsmäuse, die mit der Deletionsmutante Δ GprC infiziert waren, war ebenfalls kein Mycel gefunden worden. Die Veränderungen waren insgesamt weniger ausgeprägt als beim Wildtyp, unabhängig vom Zeitpunkt oder Zustand des Individuums bei Probennahme. Im Gegensatz dazu waren die Lungen der „GprC-comp“-Tiere den Befunden der Lungen der Tiergruppe „Wildtyp“ sehr ähnlich, da ebenfalls hyperämische Bereiche, lokale Blutungen und teilweise nekrotische Bereiche festgestellt wurden.

Versuchstiere aus den Gruppen, die mit den Stämmen Δ GprD und „GprD-comp“ infiziert wurden, wiesen ähnliche Befunde auf wie Tiere der Gruppen „ Δ GprC“ oder „cGprC“. Die Lungenschnitte der Tiere aus der Δ GprD-Gruppe waren auffällig mit Hyperämie und alveolaren Ödemen. Wie bei der „GprC-comp“-Gruppe war ein Tier, das aufgrund von hochgradiger Dyspnoe und stark reduziertem Körpergewicht und -temperatur eingeschläfert wurde, ohne besonderen Befund. Die Komplementation zur *gprD*-Deletionsmutante hatte die ausgeprägtesten Veränderungen in den Lungen hervorgerufen. In zwei der Lungenschnitte konnte Mycel nachgewiesen werden, so dass im Vergleich mit Wildtyp-infizierten Mäusen die Manifestation der Infektion bei der GprD-Komplementation am stärksten ausgeprägt war.

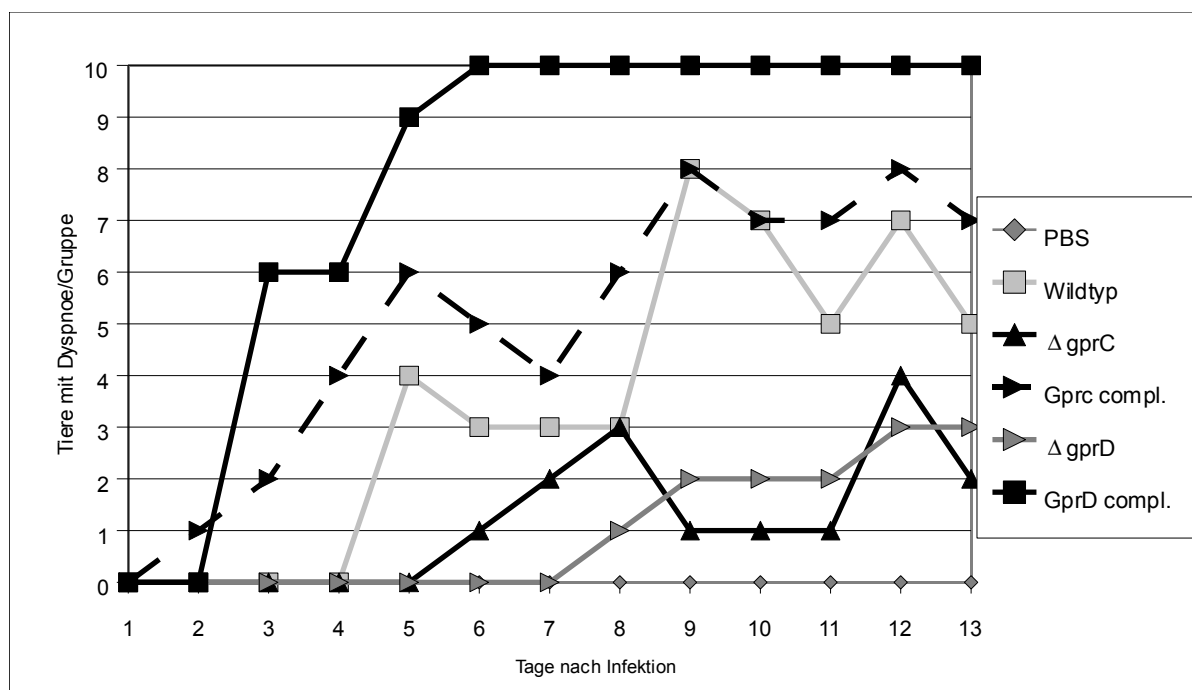


Abbildung 28: Anzahl der Tiere mit diagnostizierter Dyspnoe – zur Darstellung des Krankheitsverlaufes wurden Tiere aus einer Versuchsgruppe mit Dyspnoe gegen die Zeit aufgetragen (pers. Mitteilung, Ilse Jacobsen).

Transkriptomanalyse der Δ GprC und Δ GprD Mutante

Um einen tieferen Einblick in das Netzwerk zu erhalten, welches durch die Rezeptoren GprC und GprD reguliert wird, wurde eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Da der Phänotyp der Deletionsmutanten sich bereits unter Standardbedingungen offenbarte, wurden Proben für die Analyse eingesetzt, die unter Standardinkubationsbedingungen (AMM G50, 37 °C, 18h) gewonnen wurden.

Die Firma FEBIT (Heidelberg) wurde beauftragt, 30-mer Oligonukleotide für alle annotierten *Aspergillus fumigatus*-Transkripte der NCBI-Datenbank (Stand: Dezember 2007) zu entwickeln. In einem ersten Schritt wurden (je nach Länge des Transkripts) bis zu sechs Oligonukleotide (=Sonden) pro Transkript erstellt. Zur Validierung der Sonden und um ein Ranking der Sonden jedes einzelnen Gens zu erhalten, wurde mit einer Mischung von RNA aus einem Wildtyp und einer Deletionsmutante, die unter Standardbedingungen inkubiert wurden, „probe-hybridisiert“. Pro Array kann jeweils nur eine markierte Probe aufgetragen werden, so dass für ein Experiment, in dem zwei Zustände (A/B, A' und B' entsprechen biologischen Replikaten; Abb. 29) verglichen werden sollen, sich folgendes Auftragsschema ergab:

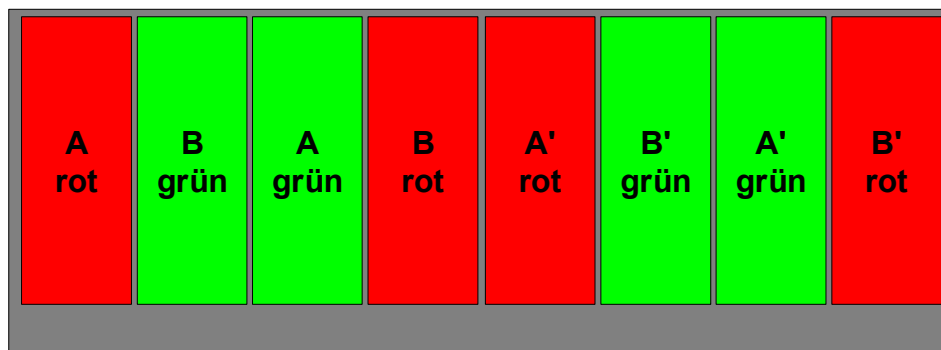


Abbildung 29: Auftragsschema für Proben auf einen GENIOM-Biochip – Die Abbildung zeigt einen GENIOM-Biochip mit acht Arrays, A/B stellen zwei miteinander zu vergleichende Zustände dar. A'/B' sind das zugehörige technische Replikat.

Die RNA, die zur Validierung der Sonden herangezogen wurde, wurde benutzt, um eine erste Hybridisierung durchzuführen. Hierbei wurden keine absoluten Werte erstellt, sondern die Ratio der Transkripte nach größer bzw. kleiner als zweifacher Unterschied sortiert. 32 Transkripte waren signifikant in der Mutante herunter und 72 Transkripte herauf reguliert. Eine Kategorisierung nach der FunCAT 2.0-Datenbank (<http://mips.gsf.de/projects/funcat>)

ergab, dass die größten Veränderungen im primären Metabolismus der Mutante auftraten (Abb. 30). Die FunCAT („functional Catalogue“-Datenbank dient der funktionellen Einordnung von Proteinen und wurde benutzt, da die Vorhersage robuster als die GO („Gene Ontology“-Datenbank ist und eine höhere Trefferquote bei Suchanfragen hat (pers. Mitteilung Daniela Albrecht).

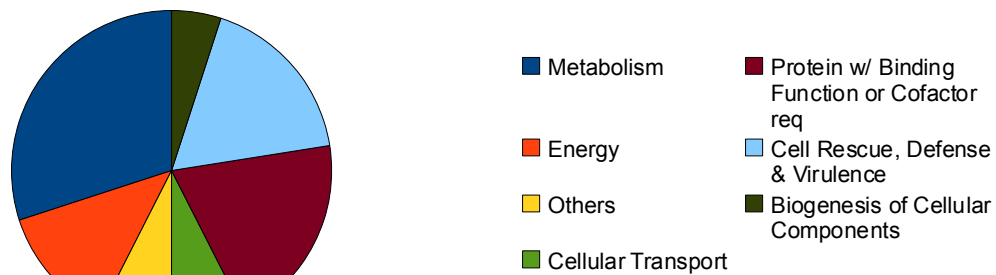


Abbildung 30: Mindesten zweifach herunter regulierte Transkripte in der Δ GprC-Mutante - klassifiziert nach FunCAT

Zu den Transkripten, die in der GprC-Deletionsmutante herunter reguliert waren, zählten zu einem großen Teil Gene des primären Metabolismus, wie die Fructose-6-phosphatkinase oder die Orotidin-5'-monophosphatdecarboxylase. Zusätzlich waren Gene dereguliert, die für eine zelluläre Stressantwort verantwortlich sind: AfuA_3G14540 („heat shock protein Hsp30/Hsp42, putative“), AfuA_5G10270 („heat shock protein, Hsp20/Hsp26, putative“) und AfuA_6G06470 („heat shock protein Hsp30-like“) (siehe Anhang für vollständige Liste). Auch der putative Transkriptionsfaktor Rpn4 (AfuA_1G13750) war im Δ GprC-Stamm herunter reguliert. In der Bäckerhefe kontrolliert Rpn4 26 von 32 Proteasom-assoziierte Gene (Mannhaupt et al., 1999) als Antwort auf zellulären Stress durch z.B. Selen (Salin et al., 2008). In derselben Arbeit wird auch eine interessante Verbindung zwischen dem oxidativen Stressregulator Yap1 und Rpn4 postuliert.

Zu den in der Δ GprC-Mutante herauf regulierten Transkripten (Abb. 32) gehörten u.a. Gene aus Sekundärmetabolismus-Clustern, wie z.B. des putativen Pseurotin A-Clusters (Maiya et al., 2007) (Abb. 31).

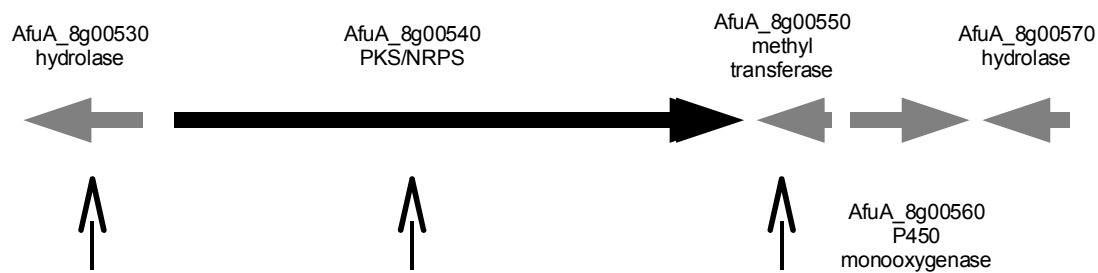


Abbildung 31: Genomischer Locus des Pseurotin A-Clusters in *A. fumigatus* – In der Transkriptomanalyse wurden herauf regulierte Transkripte (Pfeile) des Pseurotin A - Clusters detektiert (Abbildung modifiziert nach Maiya et al., 2007)

Angrenzend an das Pseurotin A-Cluster befinden sich weitere Cluster, wie z.B. das der Fumitremorgin-Biosynthese, aus dem ebenfalls mehrere Transkripte differentiell reguliert waren. Dazu gehörten u.a. eine Phytanoyl-CoA-Dioxygenase (AfuA_8G00230), die Ähnlichkeit zu einem Toxinbiosynthese-Gen (Fum3p) aus *Gibberella moniliformis* aufweist (Seo et al., 2001), und eine Dimethylallyltryptophan-Synthase mit Ähnlichkeit zu DnaW aus dem Phytopathogen *Claviceps purpurea*, die in die Alkaloid-Synthese involviert ist.

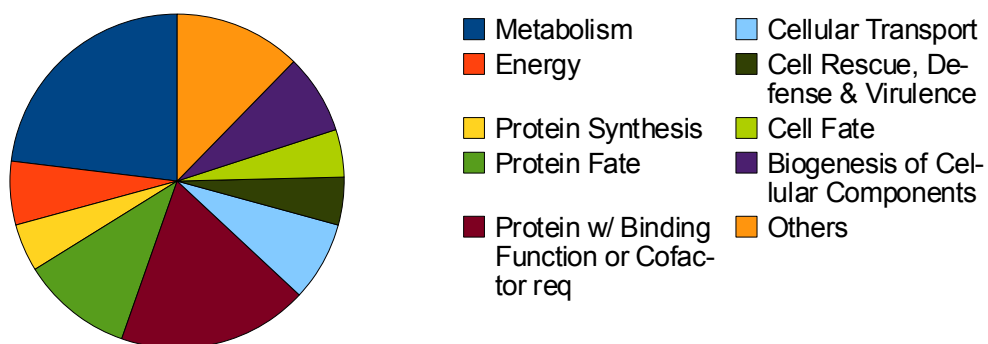


Abbildung 32: Mindesten zweifach herauf regulierte Transkripte in der Δ GprC-Mutante - klassifiziert nach FunCAT

Insgesamt waren aus dem chromosomalen Abschnitt, der die Genloci AfuA_8G00230 bis AfuA_8G00550 umfasst, zehn Transkripte in der Mutante Δ GprC herauf reguliert (siehe Anhang). AfuA_8G00420 kodiert für einen C6-Transkriptionsfaktor und könnte somit unmittelbar an der Regulation des umliegenden Clusters beteiligt sein.

Um die Ergebnisse zu verifizieren, wurde die Transkriptomanalyse wiederholt. Das verwendete System von FEBIT ermöglicht auf einem GENIOM-Biochip mit acht Arrays pro Array 15.000 Sonden. Für die Hybridisierungen mit *A. fumigatus*-Gesamt-RNA-Proben wurde allen Transkripten (knapp 10.000 nach der NCBI-Datenbank) je nach Länge des Transkript mindestens eine, maximal zwei Oligonukleotide als Sonden zugeordnet.

Bei der Wiederholung des Versuchs wurden erneut Proben des Wildtyps (CEA17 Δ akuB^{KU80}) und der Deletionsmutante Δ GprC für 18h über Nacht bei 37 °C in flüssigem AMM G50 inkubiert. Nach RNA-Isolation mittels Trisure (Bioline, Luckenwalde) und anschließender DNase Behandlung (Turbo DNase, Ambion; Austin, USA) wurden die Proben an FEBIT übergeben. Nach erfolgter Hybridisierung, inklusive Dye-Switch und biologischem Replikat, wurden die Daten extern bei FEBIT aufbereitet.

Differentiell exprimierte Gene in der Δ GprC-Mutante

Knapp 200 Transkripte zeigten eine differentielle Expression, wobei 137 in der Δ GprC-Mutante herunter- und 61 hoch reguliert waren. In den Tabellen 11/12 ist eine Auswahl der in der Deletionsmutante herauf resp. herunter regulierten Transkripte gelistet. Die Sortierung erfolgte nach der Veränderung des Verhältnis (FC, „fold change“) der normalisierten Intensitäten der jeweiligen Sonde von Mutante zu Wildtyp.

In Abbildung 33 ist eine Übersicht aller differentiell exprimierten Gene, herauf bzw. herunter reguliert, dargestellt, die einen Überblick nach KEGG-Gruppierung gibt. Die stärkste Regulation hatten Gene erfahren, die entweder am primären (Kohlenstoff-)Metabolismus, dem Erhalt des Redoxgleichgewichts oder dem Aufbau/Erhalt der Zellwandintegrität beteiligt sind. Auffällig war erneut die hohe Zahl an differentiell exprimierten Genen, die mit der Produktion von Sekundärmetaboliten in Verbindung gebracht werden.

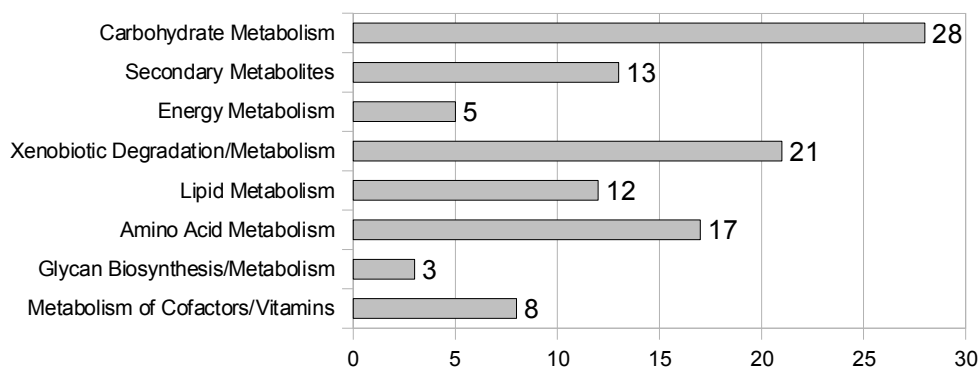


Abbildung 33: Differenziell regulierte Transkripte nach KEGG-Klassifizierung – Alle in der Transkriptomanalyse Wildtyp versus Δ GprC differenziell regulierten Transkripte wurden aufgrund ihrer Funktion nach KEGG gruppiert.

Eines der Gene, AfuA_4G07280, welches in der *gprC*-Deletionsmutante herunter reguliert war, kodiert für ein Protein, welches an der cAMP-Signaltransduktion beteiligt sein könnte. Das Ortholog aus *S. cerevisiae*, SOK1 („suppressor of kinase-mutant“), wurde als Suppressor einer Tripelmutante in Hefe ohne drei katalytische Proteinkinase A-Untereinheiten identifiziert (Ward und Garrett, 1994).

In Tabelle 11 ist eine Auswahl der am stärksten im Wildtyp herauf regulierten Transkripte im Vergleich zur *gprC*-Deletionsmutante aufgeführt.

Eine mehr als zehnfache erhöhte Expression konnte für eine Flavin-bindende Monooxygenase detektiert werden. Ein ähnlich großer Unterschied in der Expression wurde für eine Flavin-enhaltende Polyaminoxxygenase (PAO) nachgewiesen. PAOs generieren u.a. in Pflanzen Wasserstoffperoxid als Signalmolekül. Des Weiteren waren, wie in der Vorstudie bereits gezeigt, Gene des Kohlenstoffmetabolismus in der Mutante herunterreguliert: dazu gehörten Pyruvatdecarboxylase, Phosphoketolase und die Fructose-6-phosphatkinase, die als zentraler Regulator der Glykolyse gilt, da es den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (Umsetzung von Fructose-6-phosphat) katalysiert.

Tabelle 11: Auswahl der im Wildtyp herauf regulierten Transkripte

FC GprC/ WT	Accession #	Beschreibung lt. NCBI	AFU-Locus
0,09	XM_749026	flavin-binding monooxygenase, putative	AFUA_3G15050
0,1	XM_742633	flavin containing polyamine oxidase	AFUA_6G03510
0,14	XM_001481458	PTH11-like integral membrane protein (GPCR)	AFUA_5G11245
0,15	XM_748083	pyruvate decarboxylase	AFUA_5G14810
0,17	XM_743512	ankyrin repeat protein	AFUA_3G02830
0,18	XM_742021	UDP-glucose dehydrogenase Ugd1, putative	AFUA_8G00920
0,18	XM_747496	NADH oxidase, partial mRNA	AFUA_1G12210
0,2	XM_744617	dienelactone hydrolase	AFUA_2G05810
0,2	XM_746800	extracellular dipeptidyl-peptidase Dpp4	AFUA_4G09320
0,24	XM_749450	phosphoketolase	AFUA_3G10760
0,25	XM_001481557	DEAD/DEAH box helicase	AFUA_3G06922
0,26	XM_001481650	alpha-1,3-glucanase/mutanase, putative	AFUA_1G03352
0,26	XM_741860	extracellular lipase	AFUA_8G02530
0,28	XM_743078	cytochrome P450 phenylacetate 2- hydroxylase	AFUA_5G01710
0,29	XM_744966	mitochondrial integral membrane protein	AFUA_1G03090
0,3	XM_745158	sulfate transporter	AFUA_1G05020
0,3	XM_742615	sodium P-type ATPase	AFUA_6G03690
0,31	XM_746384	potassium uptake transporter, putative	AFUA_4G13540
0,31	XM_743104	NADH-dependent flavin oxidoreductase	AFUA_5G01450
0,32	XM_747005	cAMP-mediated signaling protein Sok1	AFUA_4G07280
0,33	XM_745377	6-phosphofructo-2-kinase 1	AFUA_1G07220

Transkripte, die im Δ GprC-Stamm herauf reguliert waren, konnten zu einem großen Anteil der Synthese von Sekundärmetaboliten/Toxinen zugeordnet werden (u.a. Fumitremorgin, Pseurotin A). Außerdem war die putative Glykogenphosphorylase Gph1p in der Mutante auf höherem Niveau exprimiert. Gph1p wird mit der Stressadaption durch die HOG-MAP-Kinase in *S. cerevisiae* in Verbindung gebracht (Sunnarborg et al., 2001).

Tabelle 12: Auswahl der in der *gprC*-Deletionsmutante herauf regulierten Transkripte

FC GprC/WT	Accession #	Beschreibung lt. NCBI	AFU-Locus
2,44	XM_742074	polyketide synthase	AFUA_8G00370
2,47	XM_747569	glycogen phosphorylase GlpV/Gph1, putative	AFUA_1G12920
2,48	XM_742592	iron-sulfur cluster-binding protein	AFUA_6G03920
2,5	XM_747898	alpha-glucosidase	AFUA_1G16250
2,52	XM_746174	adenylate-forming enzyme	AFUA_6G13920
2,53	XM_745679	2-oxoisovalerate dehydrogenase complex alpha subunit	AFUA_6G08830
2,54	XM_001481380	AAA family ATPase	AFUA_7G05752
2,55	XM_748892	Sad1/UNC domain protein	AFUA_5G06480
2,7	XM_743748	Rieske [2Fe-2S] domain protein	AFUA_7G06700
3,16	XM_745725	class V chitinase	AFUA_6G09310
3,2	XM_001481427	cytochrome P450 monooxygenase, putative	AFUA_6G13945
3,21	XM_743766	acyl-CoA dehydrogenase	AFUA_7G06510
3,25	XM_746263	squalene-hopene-cyclase	AFUA_4G14770
3,26	XM_742050	dimethylallyl tryptophan synthase, putative	AFUA_8G00620
3,32	XM_742056	cytochrome P450 oxidoreductase, putative	AFUA_8G00560
3,42	XM_741206	ankyrin repeat protein	AFUA_4G01580
3,57	XM_744573	C6 transcription factor	AFUA_2G05360
3,67	XM_743779	maltase partial mRNA	AFUA_7G06380
3,67	XM_743620	cytochrome P450 monooxygenase, putative	AFUA_3G03930
3,89	XM_742070	methionine aminopeptidase, type II, putative	AFUA_8G00410
4,17	XM_743236	squalene-hopene-cyclase	AFUA_5G00110
4,37	XM_742059	alpha/beta hydrolase	AFUA_8G00530
4,42	XM_743235	cytochrome P450 oxidoreductase/alkane hydroxylase	AFUA_5G00120
6,46	XM_742069	C6 finger transcription factor, putative	AFUA_8G00420
7,29	XM_744572	MFS transporter	AFUA_2G05350
7,7	XM_743903	O-methyltransferase	AFUA_7G05130

Differentiell exprimierte Gene in der Δ GprD-Mutante

Um den Einfluss der Deletion des *gprD*-Locus auf das Wachstum zu untersuchen, wurde eine vergleichende Transkriptomanalyse der Stämme Δ GprD und Wildtyp durchgeführt. Die Inkubationsbedingungen, Probenvorbereitung und das gewählte Sonden-Set waren jeweils analog zu der vorhergehenden Studie. Die Tabellen 13/14 listen die am stärksten herunter bzw.

herauf regulierten Transkripte der Analyse.

Tabelle 13: Auswahl der in der *gprD*-Deletionsmutante herunter regulierten Transkripte

FC RD/wt	Accession #	Beschreibung lt. NCBI	Afu-Locus
0,18	XM_745158	sulfate transporter	AFUA_1G05020
0,2	XM_742633	flavin containing polyamine oxidase	AFUA_6G03510
0,2	XM_744617	dienelactone hydrolase	AFUA_2G05810
0,22	XM_743512	ankyrin repeat protein	AFUA_3G02830
0,23	XM_749026	flavin-binding monooxygenase, putative	AFUA_3G15050
0,23	XM_001481427	cytochrome P450 monooxygenase, putative	AFUA_6G13945
0,24	XM_001481591	NACHT domain protein	AFUA_2G00960
0,24	XM_745901	amino acid permease	AFUA_6G11100
0,27	XM_742426	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase,	AFUA_8G07210
0,28	XM_746375	PE repeat family protein	AFUA_4G13630
0,29	XM_001481650	alpha-1,3-glucanase/mutanase, putative	AFUA_1G03352
0,3	XM_743570	ABC multidrug transporter SitT	AFUA_3G03430
0,3	XM_745377	6-phosphofructo-2-kinase 1	AFUA_1G07220
0,31	XM_746132	glutamate decarboxylase	AFUA_6G13490
0,32	XM_746384	potassium uptake transporter, putative	AFUA_4G13540
0,33	XM_742615	sodium P-type ATPase	AFUA_6G03690
0,34	XM_746800	extracellular dipeptidyl-peptidase Dpp4	AFUA_4G09320
0,34	XM_741893	proline permease	AFUA_8G02200
0,35	XM_743266	phosphoketolase	AFUA_3G00370
0,35	XM_749077	MFS multidrug transporter	AFUA_3G14560
0,35	XM_001481621	GYF domain protein	AFUA_2G13290
0,35	XM_743385	GMC oxidoreductase	AFUA_3G01580
0,35	XM_001481458	PTH11-like integral membrane protein	AFUA_5G11245
0,36	XM_747310	MFS multidrug transporter	AFUA_1G10370
0,36	XM_748083	pyruvate decarboxylase	AFUA_5G14810

0,37	XM_748932	ABC multidrug transporter Mdr1	AFUA_5G06070
0,38	XM_746826	phosphatidate cytidyltransferase, putative	AFUA_4G09060
0,38	XM_748190	carboxylesterase	AFUA_5G13710
0,39	XM_749419	pyruvate decarboxylase PdcA, putative	AFUA_3G11070

Abbildung 34 zeigt die differentiell exprimierten Gene der Transkriptomanalyse Δ GprD versus Wildtyp nach funktioneller KEGG-Kategorisierung. Wie bei der Transkriptom-Analyse *gprC*-Mutante gegen Wildtyp waren Gene des Kohlenstoffhaushalt am häufigsten dereguliert.

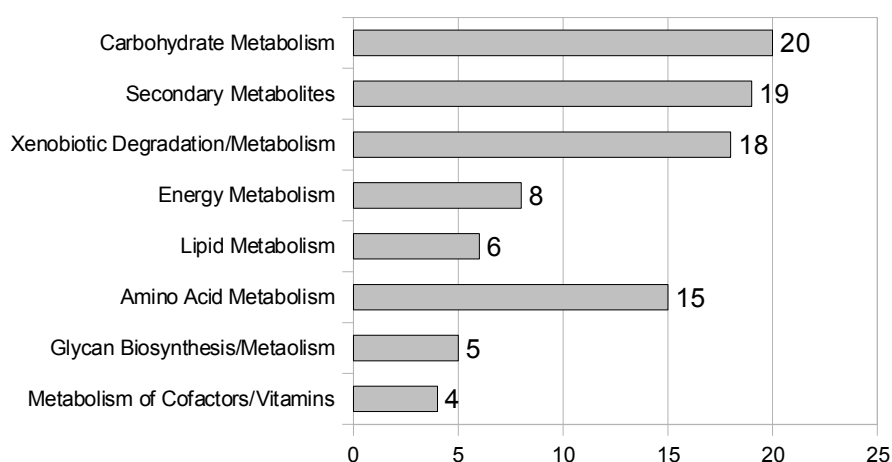


Abbildung 34: Differentiell regulierte Transkripte nach KEGG-Klassifizierung – Aufgeführt sind die in der Transkriptomanalyse Wildtyp versus Δ GprD differentiell regulierten Transkripte, gruppiert nach ihrer Funktion nach KEGG.

Des Weiteren war eine hohe Zahl Transkripte, die mit der Produktion von Sekundärmetaboliten in Verbindung gebracht werden, durch die Deletion von *gprD* dereguliert.

Hierzu gehörten zwei NRPS („Non-ribosomal peptide synthetase“)-beinhaltende Cluster AfuA_6G12040 – AfuA_6G12080 und AfuA_4G14735 – AfuA_4G14850, denen noch kein Syntheseprodukt zugeordnet werden konnte. Außerdem war unter den differentiell exprimierten Genen der Transkriptionsfaktor BrlA, der essentiell für die Konidiophorenbildung und Sporulation von *A. fumigatus* ist (Mah und Yu, 2006).

Tabelle 14: Auswahl der in der *gprD*-Deletionsmutante herauf regulierten Transkripte

FC RD/wt	Accession #	Beschreibung lt. NCBI	Afu-Locus
3,65	XM_745234	beta-glucosidase	AFUA_1G05770
3,76	XM_744573	C6 transcription factor	AFUA_2G05360
3,79	XM_742070	methionine aminopeptidase, type II, putative	AFUA_8G00410
3,8	XM_742050	dimethylallyl tryptophan synthase, putative	AFUA_8G00620
3,89	XM_745992	MAK1-like monooxygenase	AFUA_6G12060
3,96	XM_745993	FAD binding domain protein	AFUA_6G12070
3,97	XM_746174	adenylate-forming enzyme	AFUA_6G13920
4,18	XM_741206	ankyrin repeat protein	AFUA_4G01580
4,19	XM_742349	MFS multidrug transporter	AFUA_8G06410
4,42	XM_742641	C6 finger domain protein	AFUA_6G03430
4,82	XM_743779	maltase, partial mRNA	AFUA_7G06380
4,97	XM_742595	spore-specific catalase CatA	AFUA_6G03890
5,42	XM_742059	alpha/beta hydrolase	AFUA_8G00530
5,51	XM_748308	adenylate-forming enzyme AfeA	AFUA_5G12510
5,99	XM_747933	C2H2 type conidiation transcription factor BrlA	AFUA_1G16590
6,47	XM_743620	cytochrome P450 monooxygenase, putative	AFUA_3G03930
7,43	XM_744572	MFS transporter	AFUA_2G05350
8,5	XM_742069	C6 finger transcription factor, putative	AFUA_8G00420
8,73	XM_743903	O-methyltransferase	AFUA_7G05130
12,11	XM_746259	cytochrome P450 monooxygenase, putative	AFUA_4G14810
18,13	XM_746263	squalene-hopene-cyclase	AFUA_4G14770

Die Ergebnisse der Transkriptomanalysen der *gprC*- und *gprD*-Deletionsmutanten wiesen bei den differentiell regulierten Genen eine hohe Überlagerung auf. Insgesamt waren über 80 Transkripte in den Mutanten ähnlich herauf oder herunter reguliert. Zu diesen gehörten die Sekundärmetabolimuscluster für Fumitremorgin, Pseurotin A und drei weitere Gencluster ohne Produktzuweisung. Kohlenstoffmetabolismus-Transkripte, die ähnlich reguliert waren, umfassten die Fructose-6-phosphatkinase, eine Phosphoketolase, zwei Pyruvatdecarboxylasen und eine Maltase.

Proteomanalyse der Deletionsmutanten

Um weitere Erkenntnisse über die Auswirkungen der Deletion der putativen G-Proteingekoppelten Rezeptoren GprC und GprD zu erhalten, wurde das Gesamt-Proteom der

Mutanten mit Hilfe von 2D-PAGE untersucht.

Die Inkubation der Stämme erfolgte in AMM mit 50mM Glucose als Kohlenstoffquelle bei 37 °C für 20 h über Nacht. Die Mycelproben wurden nach dem Protokoll von Kniemeyer et al. (2006) aufbereitet. Die Analyse der Trypsin-verdauten Peptidfragmente erfolgte mittels Massenspektroskopie in Zusammenarbeit mit der Abteilung Biomolekulare Chemie (Robert Winkler, HKI Jena).

Die Mehrzahl der differentiell regulierten und identifizierten Proteine gehört zum primären Energie-/Kohlenstoffhaushalt (Tab. 15). So waren zwei Proteine des Pentosephosphatwegs, die Glucose-6-phosphatdehydrogenase und die Mannitol-1-phosphatdehydrogenase, in der *gprC*-Mutante herauf reguliert. Für die Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase konnten Proteinspots, die sowohl herauf als auch herunter reguliert waren, identifiziert werden. Da die Aldolase-Aktivität über Phosphorylierung erzielt wird, wurden hier die aktive und die inaktive Form identifiziert.

Tabelle 15: Auswahl der in der *gprC*-Deletionsmutante differentiell regulierten Proteine

Afu-Locus	Beschreibung lt. NCBI	FC GprD/WT
AFUA_7G02180	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	11,93
AFUA_2G15430	L-xylulose reductase (2,4-dienoyl-CoA reductase (NADPH) activity)	8,91
AFUA_3G08470	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	8,69
AFUA_1G02820	Y20 protein / Multimeric flavodoxin WrbA	8,47
AFUA_7G01370	thiosulfate sulfurtransferase, putative	8,28
AFUA_4G12730	phosphoserine phosphatase, putative	7,25
AFUA_7G06080	ubiE/COQ5 methyltransferase, putative	5,37
AFUA_4G12730	phosphoserine phosphatase, putative	5,30
AFUA_7G05660	EF-3, putative	3,62
AFUA_7G05930	metallopeptidase MepB	2,47
AFUA_2G09030	secreted dipeptidyl peptidase	2,2
AFUA_1G05620	phenylalanyl-tRNA synthetase, beta subunit	2,16
AFUA_7G06080	ubiE/COQ5 methyltransferase, putative	2,14
AFUA_3G11690	fructose-bisphosphate aldolase, class II	2,02
AFUA_7G05680	siroheme synthase/sulfate assimilation	2,00
AFUA_3G11360	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit EifCe	1,97
AFUA_6G02280	allergen Asp F3, peroxiredoxin	1,89
AFUA_1G02550	tubulin alpha-1 SU	1,85
AFUA_5G10550	ATP synthase F1, beta SU	1,81

AFUA_2G10660	mannitol-1-phosphate dehydrogenase	1,80
AFUA_2G01660	mitochondrial outer membrane translocase receptor (TOM70)	1,79
AFUA_6G08050	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	1,76
AFUA_6G10830	protein phosphatase type 2A	1,50
AFUA_1G13320	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase and related beta- hydroxyacid dehydrogenases	0,55
AFUA_7G05210	CTP synthase	0,55
AFUA_2G10610	COPI vesicle coat beta' subunit, putative / WD40 domain	0,54
AFUA_7G01860	heat shock protein (Sti1), putative	0,54
AFUA_3G11690	fructose-bisphosphate aldolase, class II	0,48
AFUA_7G05600	TPR repeat protein	0,44
AFUA_3G02270	mycelial catalase Cat1	0,4
AFUA_3G02270	mycelial catalase Cat1	0,39
AFUA_2G15290	DUF636 domain protein	0,17
AFUA_5G09230	transaldolase, TalAB	0,1
AFUA_7G01010	alcohol dehydrogenase, putative	Nur WT

Die Proteomanalyse der *gprD*-Deletionsmutante wurde unter den selben Bedingungen durchgeführt. Die Mehrzahl der in der Δ GprD-Mutante stärker exprimierten Proteine konnte mit dem Aufbau der Zellwand resp. mit der Zellintegrität assoziiert werden (Tab. 16). Hierzu zählten eine Klasse III-Chitinase, die 1,3-beta-Glucanosyltransferase Gel1 und zwei Proteine, die für die Organisation des Actincytoskeletts, verantwortlich sind: Arc16, das eine Untereinheit des Arp2/3-Komplexes darstellt, der die Actinpolymerisierung steuert, und Vip1, das an der korrekten Lokalisierung des kortikalen Actinskeletts beteiligt ist. Zusätzlich war eine Sensor-Histidinkinase (Bos1) hoch reguliert, die für das Sensieren des zellulären osmotischen Gleichgewichts verantwortlich sein könnte.

Tabelle 16: Auswahl der in der *gprD*-Deletionsmutante differentiell regulierten Proteine

AFU-Locus	Beschreibung lt. NCBI	FC GprD/wt
AFUA_1G04070	Eukaryotic translation initiation factor eIF-5A	6,41
AFUA_3G06190	cytochrome c oxidase subunit VIa, putative	2,75
AFUA_1G06350	pathogenesis associated protein Cap20, putative	2,71
AFUA_7G05140	class III chitinase, putative	2,71
AFUA_4G03920	MFS drug transporter	2,66

AFUA_6G02280	allergen Asp F3	2,39
AFUA_3G00870	GNAT family N-acetyltransferase	2,19
AFUA_2G03560	two-component osmosensing histidine kinase (Bos1)	2,14
AFUA_5G02330	major allergen and cytotoxin AspF1	2,12
AFUA_3G10700	Arp2/3 complex subunit Arc16	1,95
AFUA_2G10030	actin cytoskeleton protein (VIP1), putative	1,87
AFUA_2G08550	peptidyl-prolyl cis/trans isomerase	1,67
AFUA_3G02270	mycelial catalase Cat1 [<i>Aspergillus fumigatus</i>]	1,62
AFUA_2G05340	1,3-beta-glucanosyltransferase, Gel1	1,27
AFUA_4G13170	G-protein complex beta subunit CpcB	0,67
AFUA_1G16250	alpha-glucosidase	0,5
AFUA_4G07210	mitochondrial acetolactate synthase small subunit	0,49
AFUA_5G02470	thiamine biosynthesis protein (Nmt1)	0,47
AFUA_5G14680	conserved hypothetical protein	0,46
AFUA_8G05320	mitochondrial F1 ATPase subunit alpha	0,43
AFUA_5G06240	alcohol dehydrogenase, putative	0,43
AFUA_6G07390	isocitrate dehydrogenase LysB	0,41
AFUA_4G03410	flavohemoprotein	0,33
AFUA_2G04620	Hsp70 chaperone BiP/Kar2	0,32
AFUA_2G08360	orotidine 5'-phosphate decarboxylase PyrG	0,15

Diskussion

Signalperzeption und Signaltransduktion sind für Organismen jeglicher Art von großer Bedeutung, da so auf verschiedenste Umweltreize mit einer spezifischen zellulären Antwort reagiert werden kann. Für sessile Mikroorganismen ist die Reaktion auf z.B. extrazellulären Stress für das Überleben überlebenswichtig. Innerhalb der Eukaryoten existieren eine Vielzahl von hochkonservierten Signalkaskaden, die es den Organismen erlauben, auf externe Reize zu reagieren.

Mehrere Signalkaskaden konnten in dem human-pathogenen Pilz *Aspergillus fumigatus* bis dato identifiziert werden. Erst kürzlich wurden durch die MAP-Kinase MpkA regulierte Signalwege von Valiante et al. (2008) charakterisiert, die zur Aufrechterhaltung der Zellintegrität essentiell sind. Von Cramer et al. (2008) und Soriani et al. (2008) wurde der Calmodulin/Calcineurin-regulierte Transkriptionsfaktor CrzA in *A. fumigatus* charakterisiert. Liebmann et al. (2004) und Grosse et al. (2008) untersuchten den cAMP-PKA-Signalweg. Der Signal-auslösende Rezeptor wurde aber nicht identifiziert bzw. war nicht Ziel der Untersuchungen. Somit verblieb die Frage, was für Rezeptoren zum Repertoire von *A. fumigatus* gehören und welche Signalkaskaden durch die Rezeptoren reguliert werden.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden mehrere putative transmembrane Rezeptoren identifiziert und ausgewählte Vertreter einzelner Untergruppen deletiert. Zwei putative Kohlenhydrat-Rezeptoren wurden funktionell näher charakterisiert, um einen Einblick in das durch die beiden Rezeptoren regulierte Netzwerk zu erhalten.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) in *A. fumigatus*

Signalsensierung durch GPCRs ist eine, evolutionär betrachtet, erfolgreiche Strategie, die von allen Eukaryoten genutzt wird, um u.a. die Umgebung zu sensieren oder interzelluläre Kommunikation zu betreiben (Bockaert und Pin, 1999). Nach einer bioinformatischen Analyse sequenzierter Genome durch Schiöth und Fredriksson (2005) sind 1,6% bzw. 865 des 20000 Gene umfassenden humanen Genoms GPCRs und stellen somit die Proteinfamilie mit den meisten Vertretern. Das Genom von *A. fumigatus* kodiert für mindestens 15 putative G-Protein gekoppelte Rezeptoren und 14 weitere transmembrane Proteine, die eine hohe Ähnlichkeit zu PTH11 aus *M. grisea* aufweisen und ebenfalls die charakteristischen sieben transmembranen Helices eines GPCR besitzen. Hierbei kann aber nicht ausgeschlossen

werden, dass aufgrund von ungenauer Genannotation oder fehlerhafter Topologievorhersage noch weitere Vertreter existieren. Die Anzahl der bislang identifizierten GPCRs in *A. fumigatus* hat eine ähnliche Größenordnung wie sie z.B. Untersuchungen in *M. grisea* und *N. crassa* (Kulkarni et al., 2005) oder in *Aspergilli* (*A. nidulans*, *A. fumigatus* und *A. oryzae*) und dem Pflanzenpathogen *Fusarium graminearum* (Lafon et al., 2006) ergeben haben. Die einzelnen Klassen der GPCRs in *A. fumigatus* wurden entsprechend der Proteine definiert, anhand derer die BLAST-Analysen durchgeführt wurden.

Pheromonrezeptoren in einem Deuteromyceten

Bereits 2002 wurde von Pöggeler der Nachweis für die Existenz von für die Paarung essentiellen Genen im Genom von *A. fumigatus* erbracht. Hierbei konnten zwar Gene für zwei Pheromonrezeptoren identifiziert werden, aber nur ein Paarungstyp-Locus. „Mating type“-Loci konnten bereits in einer Vielzahl hetero-, homothallischer und asexueller Ascomyceten identifiziert werden und dienen als zentrale Regulatoren des sexuellen Reproduktionszyklus (Coppin et al., 1997; Dyer, 2007).

Paoletti et al. (2005) konnten in einer Studie mit 290 weltweit gesammelten klinischen und der Umwelt entnommenen *A. fumigatus*-Isolaten nachweisen, dass in den getesteten Stämmen eine fast gleichmäßige Verteilung beider Paarungstypen existiert. Weiterhin wurde die Expression Paarungstyp-spezifischer Gene, u.a. von Pheromonrezeptoren nachgewiesen. Pryzak et al. (2008) konnten sogar die Funktionalität des *A. fumigatus mat1-2* Gens und des dadurch kodierten HMG-Box Transkriptionsfaktors beweisen. Hierzu stellten sie das *mat1-2*-Gen unter Kontrolle des entsprechenden *A. nidulans* Promotors und konnten so in einer eigentlich sterilen *A. nidulans mat*-Deletionsmutanten volle Fertilität herstellen.

Eine Deletion des Pheromonrezeptors PreB in *A. fumigatus* hatte keine phänotypische Veränderungen zur Folge, die auf einen Zusammenhang zwischen Morphologie, Virulenz und PreB schliessen lassen konnte (Daten nicht gezeigt).

Die Deletion der Pheromonrezeptoren GprA und GprB in *A. nidulans* führte unter normalen Inkubationsbedingungen zu keinen morphologischen Veränderungen. Erst bei Induktion der sexuellen Entwicklung produzierten die Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp weniger und kleinere Cleistothecien, die eine geringere Anzahl an Ascosporen enthielten (Seo et al., 2004).

GprC und GprD sind Kohlenhydratrezeptoren

Die in dieser Arbeit identifizierten Rezeptoren GprC und GprD haben mit dem Namensgeber dieser Klasse der „Glucosesensoren“, Gpr1p aus *S. cerevisiae* keine große Ähnlichkeit. Dennoch werden die Rezeptoren, deren Entdeckung auf Sequenzähnlichkeiten auf Gpr1p zurückzuführen sind, als putative Kohlenhydrat-sensierende Rezeptoren deklariert (Kulkarni et al., 2005; Lafon et al., 2006). Deletionsmutanten in filamentösen Ascomyceten wurden bereits von Li und Borkovich (GPR-4 in *N. crassa*, 2006) und Han et al. (GprD in *A. nidulans*, 2004) charakterisiert.

Die angefertigte phylogenetische Analyse, basierend auf Aminosäuresequenz-Vergleichen, setzte GprD aus *A. nidulans* auf einen Ast mit GprC/GprD aus *A. fumigatus*, ordnete aber *N. crassa* GPR-4 bei den Pheromorezeptoren PreA/PreB ein.

In der Arbeit von Li und Borkovich wurde eine physikalische Interaktion mittels „two-hybrid“-Analyse von GPR-4 und der G α -Protein Untereinheit GNA-1 nachgewiesen. Der Phänotyp der Rezeptordeletion äußerte sich bei der Inkubation in Glycerol-haltigem Medium, da die Akkumulation von Biomasse im direkten Vergleich zum Wildtyp reduziert war. Des Weiteren konnte in den GPR-4-Mutanten kein Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels gemessen werden, wenn Glycerol-Kulturen in Glucose-haltiges Medium umgesetzt werden. In Epistasie-Experimenten wurde ein für ein konstitutiv aktives Proetin-kodierendes *gna-1*-Allel in einem *GPR-4*-Deletionsstamm exprimiert, wodurch die Deletionsphänotypen supprimiert werden konnten. So folgerten Li und Borkovich, dass GPR-4 und GNA-1 einen cAMP-Signalweg regulieren, der die zelluläre Antwort auf externe Kohlenstoffquellen reguliert (2006).

Für *A. nidulans* wurde bereits 2004 durch Han et al. eine Deletionsmutante eines Kohlenhydratrezeptor charakterisiert. In der Arbeit wurde die Identifizierung von neun putativen GPCRs, die Disruption von sechs GPCRs und die Charakterisierung einer Deletionsmutante, GprD, beschrieben. Die Hauptfunktion, die GprD zugeschrieben wird, ist die negative Regulation der sexuellen Entwicklung. So bildet die Deletionsmutante in *A. nidulans* nach vier Tagen Inkubation auf Minimalmedium Hüllezellen, die im Rahmen der Cleistothecien-Bildung von Ascomyceten gebildet werden. Die Inkubation unter Bedingungen, welche eigentlich asexuelle Entwicklungsformen induzieren (z.B. Raumtemperatur, Hochsalzstress), supprimiert den Phänotyp der GprD-Deletionsmutante. Außerdem wies die Mutante in *A. nidulans* eine stark verzögerte Germination und ein stark begrenztes Hyphenwachstum auf.

Zusätzlich wird in der Arbeit erwähnt, dass die Deletion von *gprC* keinen offensichtlichen Phänotyp hatte (Han et al., 2004).

Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemacht wurden, da sowohl die Deletion von *gprC*, als auch *gprD*, einen deutlichen Wachstumsphänotyp zeigten. Die Ergebnisse liessen sich somit nur teilweise auf die Studie von Han et al. (2004) übertragen.

Der Einfluss auf die sexuelle Entwicklung von *A. fumigatus* konnte nicht untersucht werden, da keine Inkubationsbedingungen gefunden werden konnten, die in dem Deuteromyceten die sexuelle Entwicklung induzieren.

In der Arbeit von Han et al. (2004) wurden u.a. die Transkriptionslevel von *nsdD* („no sexual development“) in einer *A. nidulans gprD*-Mutante untersucht. Das Gen kodiert für einen GATA-Transkriptionsfaktor, der ein zentraler Regulator des sexuellen Reproduktionszyklus in *A. nidulans* ist und *nsdD*-Mutanten produzieren nur asexuelle Vermehrungsformen und (Han et al., 2001). In der *gprD*-Mutante konnte eine deutlich stärkere Expression von *nsdD* sowohl in Flüssig-, als auch auf Festmedium beobachtet werden, so dass Han et al. schlussfolgerten, dass die primäre Rolle von GprD in der negativen Regulation der sexuellen Entwicklung und nicht in der Kontrolle des Hyphenwachstums liegt (2004).

Der Transkriptlevel von *nsdD* in der *A. fumigatus gprD*-Deletionsmutante ist zwar ebenfalls während des vegetativen Wachstums erhöht (Daten nicht gezeigt), führte aber zu keiner nachweisbaren Produktion von z.B. Hüllezellen oder der Anlage von Cleistothecien. So kann nur spekuliert werden, ob es eine funktionale Überlappung der beiden Proteine in *A. fumigatus* und *A. nidulans* gibt.

In der kürzlich veröffentlichten Arbeit von Grosse und Krappmann (2008) wurden *A. fumigatus nsdD*-Überexpressionsmutanten charakterisiert. Die verwendeten Konstrukte mit nativen *nsdD* oder demjenigen aus *A. nidulans* waren beide in *A. fumigatus* funktional. Eine unter induzierenden Bedingungen kultivierte Mutante wuchs, unabhängig vom transformierten Konstrukt, deutlich unterscheidbar zu einem Wildtyp. Die Kolonie war durch weniger dichtes Myzel und eine stark verzögerte Konidiophorenbildung geprägt. Durch die erhöhte Expression dieses GATA-Transkriptionsfaktors konnten weiterhin Hyphenstrukturen beobachtet werden, die einer Art Schlinge mit einem Durchmesser von ca. 20µm glichen. Diese speziellen, im Kreis gewachsenen Hyphen (Ascogon) sind eine Vorstufe in der Cleistothecien-Produktion von *A. nidulans* (Sohn und Yoon, 2002); aber auch bei verlängerter

Inkubation konnten keine fortgeschrittenen sexuellen Reproduktionsformen in der *A. fumigatus*-Mutante identifiziert werden.

Da die stärkere Expression von *nsdD* in der in dieser Arbeit charakterisierten *gprD*-Deletionsmutante keinen vergleichbaren Phänotyp hervorrief, kann davon ausgegangen werden, dass es keine direkte Regulation von *nsdD* durch den Rezeptor gibt, sondern dass vielmehr die Repression der sexuellen Entwicklung nur ein Teil des durch GprD-regulierten Netzwerkes ist.

cAMP-Rezeptoren sensieren Aminosäuren

Weiterhin kodiert das *A. fumigatus* Genom für zwei putative Rezeptoren, GprH und GprI, die Ähnlichkeiten mit cAMP-Rezeptoren aus *D. discoideum* aufweisen. In Analogie zu GPR4 aus dem human pathogenen Basidiomyceten *C. neoformans* könnten diese Rezeptoren an der Sensierung von Aminosäuren beteiligt sein (Xue et al., 2005). Das Protein GPR4 weist strukturelle Ähnlichkeit zu dem Glucoserezeptor Gpr1 aus Hefe auf, hat aber auch Sequenzähnlichkeiten mit dem cAMP-Rezeptor cAR1 aus *D. discoideum* und GprH aus *A. nidulans*.

In der Arbeit von Xue et al. (2005) konnte eine physikalische Interaktion von GPR4 und Gpa1, einer G α Protein-Untereinheit zur Aktivierung des cAMP-PKA-Signalweges, mittels des „Split-ubiquitin“-Systems bestätigt werden. Über die Messung von intrazellulärem cAMP konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass eine *gpr4*-Deletionsmutante auf die Zugabe von bestimmten Aminosäuren, wie z.B. Methionin, nicht mehr mit einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels reagierte. So postulierten Xue et al., dass GPR4 als Rezeptor für Aminosäuren die Aktivität der Proteinkinase A reguliert.

Prostaglandinrezeptoren – Kommunikation zwischen Wirt und Pathogen?

Eine weitere Klasse von, u.a. in dieser Arbeit identifizierten Rezeptoren weist Ähnlichkeiten zu humanen Prostaglandinrezeptoren auf. Prostaglandine gehören wie auch Leukotriene zu den Eicosanoiden. In Säugetieren haben diese speziellen Oxylipine besondere Bedeutung, da sie eine Vielzahl physiologischer Prozesse steuern (Funk, 2001). Die Präsenz von Eicosanoiden in Pilzen wurde zuerst von van Dyk et al. (1991) für eine Hefe nachgewiesen. Eine spätere Studie offenbarte, dass die Produktion von Oxylipinen in einer Vielzahl von pathogenen und nicht-pathogenen Pilzen nachweisbar ist (Noverr et al., 2001). Diese lipogenen Botenstoffe werden mittels Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen aus Fettsäuren

synthetisiert. Bis jetzt konnte eine Vielzahl an Phänomenen durch Oxylipin-basierte Signale in Pilzen beschrieben werden. Tsitsigiannis et al. (2004) charakterisierten die Regulation der Balance zwischen Mitosporen- und Meiosporenproduktion (asexuelle resp. sexuelle Vermehrung) in *A. nidulans* durch sogenannte Psi-Faktoren. Psi-Faktoren („precocious sexual inducer“) wurden zuerst von Champe und el-Zayat (1989) identifiziert. Hierbei handelt es sich um eine Mischung aus Hormon-ähnlichen Oxylipinen wie Olein-, Linolen- und Linolsäure (Calvo et al., 1999; Mazur et al., 1991).

Auch in *A. fumigatus* wurden bereits drei Dioxygenasemutanten beschrieben (Dagenais et al., 2008; Tsitsigiannis et al., 2005), die eine abweichende Konidienproduktion und eine verringerte Toleranz gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies aufweisen. Der interessanteste Aspekt der *A. fumigatus ppoC*-Deletionsmutante ist aber, dass diese Mutante von Makrophagen besser phagozytiert wird und auch die Überlebensrate der ingestierten Konidien reduziert ist. So gewinnen die Proteine, die als putative Prostaglandinrezeptoren identifiziert werden konnten, in Zusammenhang mit der Arbeit Tsitsigiannis et al. enorm an Bedeutung (2005). In der Studie wurden durch Arachidonsäure und das Prostaglandin PGE₂, zwei typische Vertreter humaner Eicosanoide, ausgelösten Effekte auf die Sporulation von *A. fumigatus* und *A. nidulans* getestet. Mit steigender Konzentration wurde die Konidiophoren-bildung stärker supprimiert. Hinzu kommt, dass die Genome beider Pilze sowohl für Cyclooxygenasen, als auch Lipxygenase kodieren, so dass *A. fumigatus* und *A. nidulans* auch in der Lage sind, Oxylipine aus Fettsäuren *de novo* zu synthetisieren. Tsitsigiannis et al. diskutierten bereits über eine Oxylipin-vermittelte Form der Kommunikation zwischen *Aspergillus*-Pathogen und humaner Wirtszelle. Die Hypothese, dass Botenstoffe des Pathogens modulierend in das Immunsystem eingreifen, erscheint nicht abwegig. Eine in diesem Zusammenhang erschienene Arbeit von Noverr et al. (2003) beschreibt eben dieses Phänomen bei *Cryptococcus neoformans*. Eine sekretierte Phospholipase (PLB1) wird in Verbindung mit der Produktion von Eicosanoiden gebracht, die Deletionsmutante ist avirulent und produziert geringere Mengen Eicosanoide. In einer Infektionsstudie mit einer PLB1-Mutante konnten deutlich geringere Level der Prostaglandine PGE₂, PGF₂α und CysLT in der Mauslunge nachgewiesen werden. Auch die Anzahl an Leukozyten, Eosinophilen und Makrophagen war geringer, obwohl nicht vollständig geklärt werden konnte, ob der Ursprung der reduzierten Immunzellen das Pathogen oder der Wirt ist (Noverr et al., 2003).

Die Arbeitsgruppe um Brodhagen und Keller (2007) erbrachte einen weiteren Hinweis für

eine mögliche Kommunikation zwischen Pflanzenpathogen (*A. nidulans*) und Wirt (Erdnuss). Sie konnten volle Virulenz in einer *A. nidulans ppo*-Mutante durch die Expression eines Pflanzen Oxylinbiosynthese-Gens (*ZmLOX3*) wiederherstellen, zum anderen wiesen sie den Einfluss des Pathogens auf die Expression von LOX(Lipoxygenase)-Genen der Erdnuss nach. Wenn Prostaglandin-artige Rezeptoren in *A. fumigatus* ebenfalls eine Bedeutung während der Infektion hätten, wäre die Suche nach putativen Liganden bzw. Eicosanoiden, die regulierend auf die Wirtsantwort oder das Wachstum des Pilzes während der Infektion wirken, von außerordentlichem Interesse.

Eine Klasse Pezizomycota-spezifischer GPCRS: PTH11

Die PTH11-ähnlichen GPCRs repräsentieren mit 61 Vertretern die größte Gruppe transmembraner Rezeptoren in *Magnaporthe grisea* (Kulkarni et al., 2005). Pth11p wurde zuerst von de Zwaan et al. (1999) in einem Mutagenese-Screen identifiziert, da in Mais-Infektionsstudien die Virulenz der Mutante im Vergleich zum Wildtyp drastisch reduziert war. Die Bildung von Appressorien, der infektiösen Struktur von *M. grisea*, lag bei nur 10-15% des Wildtyps. Durch die externe Gabe von cAMP oder Diacylglycerol (Aktivatoren der PKA bzw. PKC) konnte das Wildtyp-Niveau aber wiederhergestellt werden (de Zwaan et al., 1999). In *A. fumigatus* konnten nur 14 PTH11-ähnliche Proteine identifiziert werden (diese Arbeit). Eine Datenbanksuche nach „PTH11“ in dem sequenzierten Stamm *A. fumigatus* Af293 liefert 12 Treffer, wobei nach der in dieser Arbeit durchgeführten Analyse aber nicht alle dieser Kandidaten die GPCR-Charakteristika (sieben transmembrane Helices, extrazellulärer N-Terminus) aufweisen. So werden die 14 Proteine, die in Tabelle 3 (Ergebnisteil) aufgeführt sind, nicht ausschliesslich als PTH11-ähnlich klassifiziert.

Die Untergruppe der CFEM-Domäne-tragenden GPCRs ist in *A. fumigatus* nicht präsent. Eine Analyse der NCBI-Datenbank ergab zwar, dass drei Proteine mit CFEM-Domänen in *A. fumigatus* existieren, diese aber keine typische GPCR-Topologieverteilung aufweisen.

Homologe dieser Klasse PTH11-ähnlicher Rezeptoren konnten nur in Vertretern der Pezizomycota („echten Schlauchpilze“) nachgewiesen werden, wobei das *M. grisea*-Genom bislang für die größte Anzahl kodiert (Kulkarni et al., 2005). So kann spekuliert werden, ob sich diese Proteine in anderen phylogenetischen Gruppen durch evolutionäre Mechanismen zu stark verändert haben und in Sequenzanalysen unkenntlich geworden sind oder ob sie nur spezifisch für diese Pilz-Unterabteilung sind.

GprC-eGFP hat eine GPCR-typische Lokalisation

Ein G Protein-gekoppelter Rezeptor muss nach Bindung eines Liganden und der Signalweiterleitung in die Zelle desensitiert werden, um ein konstitutives Signal zu verhindern. Dazu kann der Rezeptor internalisiert werden, was ein konservierter Prozess ist, der dazu führt, dass das Protein entweder zur Degradation freigegeben wird oder wieder zur Zelloberfläche transportiert wird (zur Übersicht: Luttrell, 2008).

Xue et al. (2005) machten sich diese Rezeptorinternalisierung zu Nutze und führten Experimente durch, bei denen eine *GPR4-dsRed*-exprimierende *C. neoformans*-Mutante während der Inkubation mit verschiedenen putativen Liganden gefüttert wurde. So konnte in einen Zeitrahmen von 60 Minuten beobachtet werden, wie auf Zugabe von Methionin oder bei Inkubation in YPGly-Medium (Glycerol als einzige Kohlenstoffquelle) das Fusionsprotein zuerst internalisiert wurde und mittels Vesikel-Transport (nach 30 Minuten) in Vakuolen (60 Minuten) deponiert wurde.

Ein weiterer Rezeptor mit bekannten Liganden ist Gpr1p aus *S. cerevisiae*. Lemaire et al. (2004) konnten zeigen, dass ausgehungerte Hefezellen mit einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels auf Glucose und Saccharose reagierten, wohingegen Mannose als Antagonist des Rezeptors agierte. Andere Zucker, wie Fructose oder Galactose hatten keinen Einfluss auf die antagonistische Wirkung von Mannose auf Saccharose/Glucose-aktivierte cAMP-Signale in der Hefe (Lemaire et al., 2004).

Um einen Hinweis auf die putative Liganden für GprC und GprD in *A. fumigatus* zu erlangen, sollten zwei Ansätze verfolgt werden. Die Messung des intrazellulären cAMP-Spiegels konnte aber leider nicht etabliert werden, da eine Vielzahl kommerzieller Lösungen auf polyklonale Antikörper bauen, die eine hohe Kreuzreaktivität mit *A. fumigatus* Antigenen haben und zu unspezifischen Ergebnissen führten (Daten nicht gezeigt). Somit verblieben nur Untersuchungen anhand von Fluoreszenzproteininfusionen.

Unter der Annahme, dass es sich bei GprC um einen Kohlenhydratsensor handelt, wurde auf Medien mit verschiedenen C-Quellen die Lokalisation des Fusionsproteins untersucht. Interessanterweise konnte das GprC-eGFP-Konstrukt nie ausschliesslich in der Membran beobachtet werden, was der Fall wäre, wenn der Rezeptor keine Aktivierung/Internalisierung erfahren würde. Wenn die GFP-Stämme auf Acetat, Ethanol oder Medium ohne C-Quelle angezogen wurden, war ebenfalls keine Lokalisation in der Membran und auch kein

Vesikeltransport zu erkennen. Eine systematische Analyse der Lokalisation in *Aspergillus*-Minimalmedium, mit jeweils einer veränderten Komponente (C-/N-Quelle, Mg^{2+} , etc.) liess gleichermassen keinen Rückschluss auf eine Liganden-spezifische Internalisierung des Rezeptors zu (Daten nicht gezeigt).

Die in dieser Arbeit angefertigten Aufnahmen zeigten aber stets einen Fluoreszenzgradienten in der Membran: mit der größten Intensität an der Hyphenspitze, die mit größerer Entfernung von der Spitze abnahm. Auch die Beladung von Vesikeln mit der Rezeptor-eGFP-Fusion nahm mit größerer Entfernung von der Hyphenspitze ab, so dass die Fluoreszenz in den älteren Hyphen nur noch in Vakuolen detektiert werden konnte. Interessanterweise konnte die Fluoreszenz des Fusionsproteins auch in Septen lokalisiert werden.

Eine ähnliche Verteilung ist u.a. in *Schizosaccharomyces pombe* für das Protein Bgs1p beschrieben worden, welches eine putative katalytische Untereinheit einer 1,3- β -D-Glucansynthase darstellt (Cortés et al., 2002). Hier konnte die Proteinfusion ebenfalls in Bereichen aktiven Wachstums und bei sich neu-bildenden Septen nachgewiesen werden.

Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass GprC (und wahrscheinlich auch GprD) an Orten aktiven Zellwand-/Membranwachstums als Anker für an der Biosynthese beteiligte Proteine fungiert.

Polaritätsdefekte in den Mutanten

Die zelluläre Verteilung des Rezeptors bekommt bei der Betrachtung des Phänotyps der Deletionsmutante eine zusätzliche Bedeutung. Sporen der Stämme Δ GprC und Δ GprD, die bei erhöhter Temperatur inkubiert werden, wachsen länger isotrop, wodurch die Keimlinge stärker anschwellen als bei Wildtypkonidien unter denselben Bedingungen. Eine Inkubation bei 37 °C führte dazu, dass die Sporen zwar auskeimten, aber die Hyphen verdickt und häufiger verzweigt waren als ein unter denselben Bedingungen angezogener Wildtyp, so dass die Deletion der Rezeptoren vermutlich einen Polaritätsdefekt zur Folge hatte.

In Aspergillen wurden bereits eine Vielzahl von Mutationen oder Deletionen mit fehlerhafter Etablierung von Polaritätsachsen in Verbindung gebracht. In dem Modellorganismus *A. nidulans* wurden von Momany et al. (1999) acht *swo*-Mutanten („swollen“) isoliert, die einen Temperatur-abhängigen Defekt in der Etablierung oder Aufrechterhaltung des polaren Wachstums hatten. Die Gendefekte konnten in den letzten Jahren mit definierten Funktionen assoziiert werden: z.B. *swoA* kodiert für die O-Mannosyltransferase PmtA (Shaw und

Momany, 2003). In *S. cerevisiae* werden durch PMTs u.a. die Zellwandintegrität sensierenden Proteine Wsc1p und Mid2p (Philip und Levin, 2001) mannosyliert. Da eine Vielzahl an sekretierten oder membranständigen Proteinen glycosyliert wird, könnte z.B. ein das gerichtete, polare Wachstum unterstützende Membranprotein aufgrund fehlerhafter Lokalisation für den beobachteten Defekt in der *swoA*-Mutante verantwortlich sein. Des Weiteren wurde *swoF* als N-Myristoyltransferase (NMT) identifiziert (Shaw et al., 2002), bei der die vorliegenden Temperatur-sensitiven Phänotypen ebenfalls auf eine fehlende Modifikation von NMT Zielgenen zurückzuführen ist.

In *A. fumigatus* wurden Polaritätsdefekte u.a. bei Mutationen resp. Deletionen von kleinen GTPasen der *ras*-Familie (Fortwendel et al., 2004; 2005), Komponenten des Calmodulin/Calcineurin-Signalweges (da Silva-Ferreira et al., 2006/2007; Steinbach et al., 2006; Cramer Jr. et al., 2008) oder des MpkA MAP-Kinase-Signalweges (Valiante et al., 2008) beschrieben. Die Vielzahl der zellulären Defekte, die zu einem abnormalen Wachstum führen, macht deutlich, dass zur Aufrechterhaltung des polaren Wachstums das Zusammenspiel äußerst komplexer Netzwerke nötig ist.

Eine Deletion der GTPase *rasB* in *A. fumigatus* führte zu verzögerter Germination, kleineren Kolonien und einer stärkeren Verzweigung der Hyphen, so dass die Deletionsmutante nicht signifikant weniger Biomasse in Flüssigkultur bildete als der Wildtyp unter vergleichbaren Inkubationsbedingungen (Fortwendel et al., 2005). Der Phänotyp der Deletionsmutanten Δ GprC und Δ GprD kann nur partiell mit dem der *rasB*-Mutante in Einklang gebracht werden, da gerade die Koloniemorphologie gegen eine Beteiligung von RasB an durch Rezeptoren regulierte Signalwege spricht. Andererseits wies die Anordnung und die Verzweigung der Hyphen eine große Ähnlichkeit zu dem Phänotyp der beiden Rezeptormutanten in *A. fumigatus* auf.

Eine auffällige phänotypische Ähnlichkeit haben Mutanten des Calmodulin-Calcineurin-Signalweges im Vergleich zu Δ GprC und Δ GprD (da Silva-Ferreira et al., 2007). Die *calA*-Deletionsmutante unterschied sich von dem Wildtyp vor allem durch die Kolonie- und Hyphenmorphologie. Das radiale Wachstum war ähnlich der in dieser Arbeit charakterisierten Rezeptormutanten stark eingeschränkt. Bei mikroskopischer Betrachtung wiesen die Ränder der Kolonie ein deutlich dichteres hyphales Netzwerk auf. Die auskeimenden Sporen

wuchsen länger isotrop und bildeten mehr Keimschläuche als Wildtypkonidien unter vergleichbaren Bedingungen. Die ausgebildeten Hyphen wiesen zudem eine charakteristische, dichotome Verzweigung an der Spitze auf. Die Virulenz der *calA*-Mutante war zudem stark reduziert, was sehr wahrscheinlich mit dem ausgeprägten Wachstumsdefekt und dem Fehlen typischer „rodlet“-Strukturen auf der Oberfläche von Sporen zusammenhängt, was vermutlich eine verminderte Gewebsadhäsion zur Folge haben könnte (da Silva-Ferreira et al., 2007).

Infektionsstudien in einem murinen Niedrigdosis-Modell nach Liebmann et al. (2004) wurden mit beiden Mutanten, Δ GprC und Δ GprD, und den jeweiligen Komplementationstämmen durchgeführt. Die Infektion von neutropenischen Mäuse zeigte, dass beide Deletionsmutanten in ihrer Virulenz attenuiert sind. Die Reduktion der Fitness bei der Infektion kann zu einem großen Teil auf das reduzierte Wachstum und die verlangsamte Keimung zurückzuführen sein. Dem gegenüber steht aber die Beobachtung, dass das Wachstum eines *A. fumigatus* Wildtypstammes bei der Kolonisierung der Mäuselunge in seinem Aussehen an den Wachstumsdefekt der Rezeptormutanten erinnert (Brock, pers. Mitteilung). Dies lässt Raum für die Spekulation, ob nicht auch andere, durch die Deletionen hervorgerufene Veränderungen zu einer weiteren Reduktion der Virulenz geführt haben, da reduziertes Wachstum bzw. langsamere Extension der Hyphen nicht unbedingt zu einer Reduktion der Virulenz führen muss. Dieses konnte für die *mpkA*-Mutante in *A. fumigatus* von Valiante et al. (2008) nachgewiesen werden. Die Kolonien der *mpkA*-Mutante waren sehr kompakt und das Wachstum war langsamer als beim Wildtyp, dennoch war die Deletionsmutante in einem murinen Infektionsmodell voll virulent.

Was regulieren die beiden Rezeptoren GprC und GprD?

Zum besseren Verständnis der Auswirkungen der Deletionen auf den *A. fumigatus* Metabolismus wurden Transkriptom- und Proteomanalysen durchgeführt.

Am auffälligsten war der große sich überlappende Bereich der Daten. Von den 180 (GprD) bis 200 (GprC) der differentiell regulierten Transkripte in den beiden Deletionsmutanten konnten jeweils 80 Gene in beiden Datensätzen gefunden werden.

Zu den Transkripten, die in beiden Mutanten herunter reguliert waren, zählten u.a. Gene des Primärstoffwechsel wie die 6-Phosphofructokinase (PFK), die Pyruvatdecarboxylase PdcA und eine Phosphoketolase. Die PFK ist das Schlüsselenzym der Glycolyse, da es den initialen

Schritt, die Umsetzung von Fructose-6-phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat, katalysiert. Das Protein PdcA katalysiert die Decarboxylierung von Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse. Im Δ GprC-Stamm war *pdca* eines der am stärksten deregulierten Transkripte. So lässt sich darüber spekulieren, ob die Rezeptoren nicht doch in die Sensierung und Regulierung des Primärmetabolismus involviert sind.

In der Δ GprC-Mutante ist der mRNA-Level von AfuA_2G09890, einem NDT80/PhoG-ähnlichen DNA-bindenden Protein, höher. Das Ortholog in *A. nidulans*, XprG, reguliert extrazelluläre Proteasen, so dass eine Nullmutante nicht mehr auf Proteinen als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle wachsen kann. Katz et al. (2006) spekulieren weiterhin über die Rolle von XprG in der allgemeinen zellulären Antwort auf Hungerbedingungen. Das ist im Einklang mit der Beobachtung, dass *S. cerevisiae* Ndt80 ebenfalls in die Sensierung des Ernährungszustandes involviert ist, in der Hefe aber auch die Expression von Meiose-spezifischen Genen reguliert (Hepworth et al., 1998).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Proteomanalysen gaben hierzu weitere Hinweise, da zumindest in der Δ GprC-Mutante z.B. die Glucose-6-phosphatdehydrogenase stärker exprimiert war. G6PDH ist ein Enzym, das den limitierenden Schritt des Pentosephosphat-Zyklus, die Umsetzung von Glucose-6-phosphat zu 6-Phosphoglucono- δ -lacton, katalysiert. Dabei werden der Zelle Reduktionsäquivalente in Form von NADPH zur Verfügung gestellt, die zur Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichts durch Thioredoxin und Glutathion nötig sind, wie von Thön et al. (2008) für *A. nidulans* nachgewiesen wurde. Den direkten Zusammenhang zwischen Glutathion und der Aktivität der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase konnten Llobell et al. (1988) in der Bäckerhefe zeigen.

Ein Redoxungleichgewicht könnte auch zu den beschriebenen zellulären Defekten führen, da, wie bereits erwähnt, der Pentosephosphatweg auch genutzt wird, um die Zelle mit Reduktionsäquivalenten zu versorgen. Semighini und Harris (2008) haben in einer kürzlich erschienenen Arbeit eine interessante Beobachtung in Bezug auf die Ursache von sich abnormal verzweigenden Hyphen gemacht. Sie konnten das polare Wachstum in eine direkte Verbindung zu der Etablierung und Aufrechterhaltung eines ROS-Gradienten in den Hyphen bringen. Das Phänomen der „apikalen Dominanz“ beschreibt die Unterdrückung lateraler Hyphenverzweigung unter normalen Wachstumsbedingungen in der Nähe der Hyphenspitze. Semighini und Harris konnten ROS somit als ein weiteres Signalmolekül, das an polarem Wachstum beteiligt ist, nachweisen und lieferten erste Hinweise, dass zur Generierung von

ROS eine NADPH-Oxidase oder ein funktionell ähnliches Flavoprotein dienen (2008).

Da in dieser Arbeit eine Vielzahl an Transkripten und Proteinen identifiziert werden konnte, die direkt oder indirekt an der Umsetzung oder Erzeugung von ROS beteiligt sind, könnte auch der Einfluss eines gestörten ROS-Gradienten Ursache des Phänotyps der Mutanten sein. Zu den am stärksten herunter regulierten Transkripten in den beiden Rezeptormutanten gehörten u.a. eine Flavin-Polyaminoxidase und eine Flavin-bindende Monooxygenase und in dem Δ GprC-Stamm die NADPH-Oxidase, die von Semighini und Harris als maßgeblich für die Etablierung von Polaritätsachsen bezeichnet wird (2008).

Auch die Rolle von Calcium für das Hyphenwachstum wurde von mehreren Gruppen untersucht. So konnten Schmid und Harold (1988) bestätigen, dass zur Ausbildung normaler Hyphen in *N. crassa* Calcium essentiell ist. In der selben Arbeit konnten sie mittels Chlortetracyclin-Färbung einen Gradienten für Calcium identifizieren, der ein apikales Maximum aufwies. Die Störung des Gradienten durch Zugabe eines Calciumionophors führte dazu, dass die Hyphen von *N. crassa* weiterhin wuchsen, aber nahe der Spitze laterale Verzweigungen anlegten. Da die Hyphenspitzen der Rezeptormutanten auch einen hohen Grad an Verzweigungen aufwiesen, kann die defekte Etablierung des polaren Wachstums eventuell durch einen gestörten Calciumgradienten verursacht sein.

Eine weitere wichtige Rolle von Calcium liegt in der Aktivierung der Proteinphosphatase Calcineurin mittels Calmodulin, welches als Adaptorprotein dient. Calcineurin-Deletionsmutanten sind durch starke Wachstumsdefekte charakterisiert (Steinbach et al., 2006; da Silva-Ferreira et al., 2007). Bemerkenswerterweise konnte für eine Δ *calA*-Mutante in *A. fumigatus* auch ein verändertes Spektrum an produzierten Sekundärmetaboliten identifiziert werden. Pupo et al. (2006, Abstract zum „Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy“) isolierten nach Ethylacetat-Extraktion fünf Substanzen, die im Kulturüberstand des Wildtyps fehlten. Zu den isolierten Substanzen gehörte das Spirotryprostatin A, das aufgrund seiner Eigenschaften als Zellzyklusinhibitor als Grundlage für Zytostatika gehandelt wird (Edmondson et al., 1999). Diese Beobachtung gewinnt an Bedeutung, wenn man die Ergebnisse der Transkriptomanalysen der in dieser Arbeit charakterisierten Rezeptormutanten betrachtet. Da zwar die Synthese von Spirotryprostatin aufgeklärt ist (Edmondson und Danishefsky, 1998), die beteiligten Gene aber noch nicht identifiziert sind, kann nur gemutmaßt werden, ob unter den betroffenen Genclustern der, der

zur Synthese der Substanz nötig ist, ebenfalls differentiell reguliert ist.

Somit ergibt sich abschließend folgendes Bild für die durch die Rezeptoren GprC und GprD beeinflussten intrazellulären Prozesse.

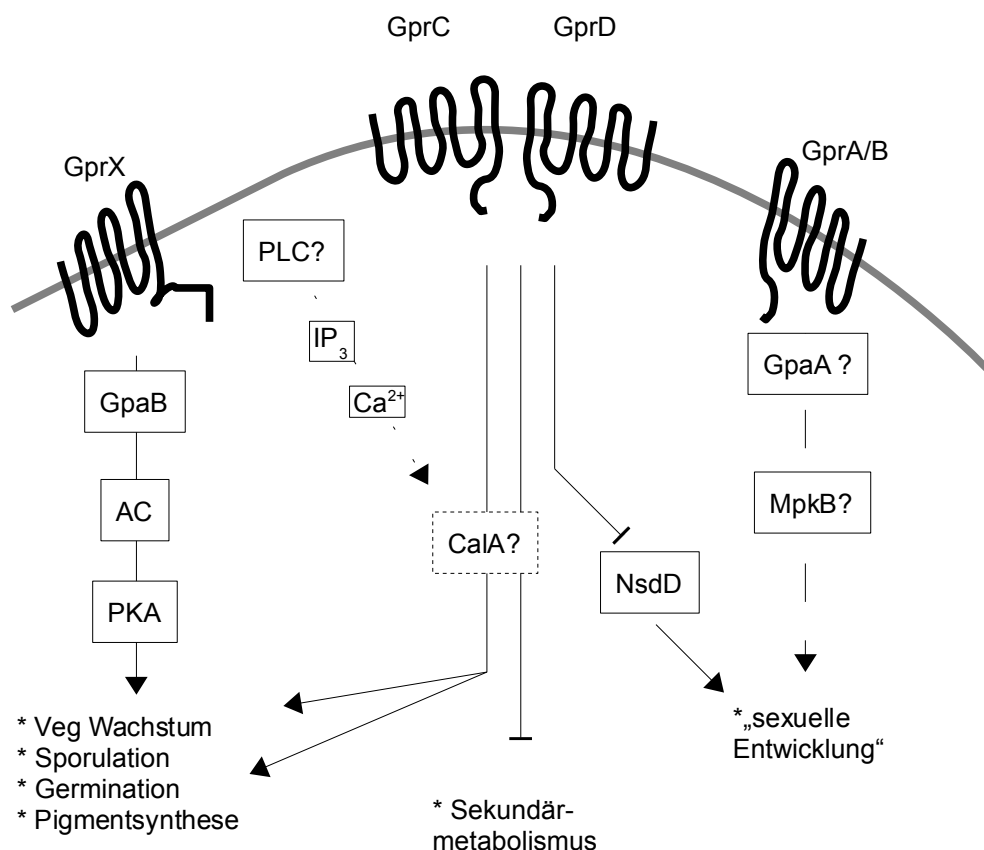


Abbildung 35: Modell zur Signalweiterleitung von GprC und GprD in *A. fumigatus*

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, kodieren die heptahelikalen Proteine GprC und GprD für funktionale Rezeptoren, deren Deletion das Wachstum von *A. fumigatus* beeinflusst. In Abb. 35 ist ein Modell dargestellt, das GprC und GprD in Zusammenhang mit anderen bekannten Signalwegen in *A. fumigatus* stellt. Wie von Liebmann et al. (2003; 2004) nachgewiesen, aktiviert die cAMP-PKA-Signalkaskade das vegetative Wachstum. Für GprC und GprD konnte gezeigt werden, dass sie ebenfalls aktivierend auf Wachstum und Germination wirken. Dies muss aber unterhalb der Ebene der Proteinkinase A geschehen, da die externe Zugabe von cAMP nicht zur Komplementierung des Phänotyps führte.

Somit bleibt die Frage: welche Signalwege aktivieren GprC und GprD? Da die Deletionen der $G\alpha$ -Proteine (GpaA, GpaB, GpaC) keinen vergleichbaren Phänotyp aufwies, ist es

unwahrscheinlich, dass es nur eine Signalweiterleitung über $G\alpha$ Proteine gibt. Am wahrscheinlichsten ist eine Interaktion mit einem Phospholipase-Inositoltriphosphat (IP_3)- Ca^{2+} -Signalweg, der in die Proteinphosphatase Calcineurin mündet. Schumacher et al. (2008) konnten in dem Erreger des Grauschimmels, *Botrytis cinerea*, eine Interaktion zwischen einer $G\alpha$ -Protein-Untereinheit und Calcineurin über eine Phospholipase, IP_3 und Calcium nachweisen.

Die Suche nach möglichen Liganden für GprC und GprD erweist sich als schwierig, da ohne Kenntnis der Signalwege und einer daraus möglichen Ableitung eines „Read out“-Systems keine gezielten Studien möglich sind. Somit sollte das Hauptaugenmerk auf die Untersuchung der durch die Rezeptoren regulierten Signalwege gelegt werden, wobei die Calmodulin/Calcineurin-Kaskade anhand der hier erzielten Resultate am naheliegendsten erscheint.

E. Literaturverzeichnis

- Bahn, Y.S. et al., 2007. Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat Rev Microbiol*, 5(1), 57-69.
- Bahn, Y. & Mühlischlegel, F.A., 2006. CO₂ sensing in fungi and beyond. *Current Opinion in Microbiology*, 9(6), 572-8.
- Baida, G.E. & Kuzmin, N.P., 1995. Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1264(2), 151-4.
- Baker, D.A. & Kelly, J.M., 2004. Structure, function and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases. *Molecular Microbiology*, 52(5), 1229-42.
- Bockaert, J. & Pin, J.P., 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO Journal*, 18(7), 1723-9.
- Borkovich, K.A. et al., 2004. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 68(1), 1-108.
- Bölker, M., 1998. Sex and crime: heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 25(3), 143-56.
- Brakhage, A.A. & Langfelder, K., 2002. Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. *Annu Rev Microbiol*, 56, 433-55.
- Brodhagen, M. et al., 2008. Reciprocal oxylipin-mediated cross-talk in the *Aspergillus*-seed pathosystem. *Molecular Microbiology*, 67(2), 378-91.
- Calvo, A.M. et al., 1999. Sporogenic effect of polyunsaturated fatty acids on development of *Aspergillus spp.* *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3668-73.
- Champe, S.P. & el-Zayat, A.A., 1989. Isolation of a sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 171(7), 3982-8.
- Chasse, S.A. et al., 2006. Genome-scale analysis reveals Sst2 as the principal regulator of mating pheromone signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 5(2), 330-46.
- Colombo, S. et al., 1998. Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 17(12), 3326-41.
- Coppin, E. et al., 1997. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 61(4), 411-28.
- Cortés, J.C.G. et al., 2002. Localization of the (1,3)beta-D-glucan synthase catalytic subunit homologue Bgs1p/Cps1p from fission yeast suggests that it is involved in septation, polarized growth, mating, spore wall formation and spore germination. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 21), 4081-96.
- Cowen, L.E. & Steinbach, W.J., 2008. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryotic Cell*, 7(5), 747-64.
- Cramer, R.A. et al., 2008. Calcineurin target CrzA regulates conidial germination, hyphal growth, and pathogenesis of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, 7(7), 1085-97.
- d'Enfert, C., 1996. Selection of multiple disruption events in *Aspergillus fumigatus* using the orotidine-5'-decarboxylase gene, pyrG, as a unique transformation marker. *Curr Genet*, 30(1), 76-82.

- Dagenais, T.R.T. et al., 2008. Defects in conidiophore development and conidium-macrophage interactions in a dioxygenase mutant of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*, 76(7), 3214-20.
- Denning, D.W., 1998. Invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 26(4), 781-803; quiz 804-5.
- DeZwaan, T.M. et al., 1999. Magnaporthe grisea pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell*, 11(10), 2013-30.
- Dürrenberger, F. & Kronstad, J., 1999. The ukc1 gene encodes a protein kinase involved in morphogenesis, pathogenicity and pigment formation in *Ustilago maydis*. *Molecular & General Genetics: MGG*, 261(2), 281-9.
- van Dyk, M.S. et al., 1991. Isolation of a novel arachidonic acid metabolite 3-hydroxy-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid (3-HETE) from the yeast *Dipodascopsis uninucleata* UOFs-Y128. *FEBS Letters*, 283(2), 195-8.
- Edmondson, S.D. & Danishefsky, S.J., 1998. The Total Synthesis of Spirotryprostatin A. *Angewandte Chemie International Edition*, 37(8), 1138-1140.
- Fillinger, S. et al., 2002. cAMP and ras signalling independently control spore germination in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 44(4), 1001-16.
- Filmore, D., 2004. It's a GPCR world! *Mod Drug Disc*, 7(11), 24-28.
- Forsberg, H. & Ljungdahl, P.O., 2001. Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 40(2), 91-109.
- Fortwendel, J.R. et al., 2005. A fungus-specific ras homolog contributes to the hyphal growth and virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell*, 4(12), 1982-9.
- Fortwendel, J.R. et al., 2004. *Aspergillus fumigatus* rasA and rasB regulate the timing and morphology of asexual development. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 41(2), 129-39.
- Fredriksson, R. & Schioth, H.B., 2005. The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol*, 67(5), 1414-25.
- Fujita, A. et al., 2004. Rax1, a protein required for the establishment of the bipolar budding pattern in yeast. *Gene*, 327(2), 161-9.
- Funk, C.D., 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5548), 1871-5.
- Gadd, G.M., 1994. Signal Transduction In Fungi. In *The Growing Fungus*. S. 183-210.
- Galagan, J.E. et al., 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, 438(7071), 1105-15.
- Galagan, J.E. et al., 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 422(6934), 859-68.
- Gilman, A.G., 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annual Review of Biochemistry*, 56, 615-49.
- Götz, R., Gnann, A. & Zimmermann, F.K., 1999. Deletion of the carbonic anhydrase-like gene NCE103 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* causes an oxygen-sensitive growth defect. *Yeast (Chichester, England)*, 15(10A), 855-64.

- Gorovits, R. & Yarden, O., 2003. Environmental suppression of *Neurospora crassa* cot-1 hyperbranching: a link between COT1 kinase and stress sensing. *Eukaryotic Cell*, 2(4), 699-707.
- Grosse, C. et al., 2008. Protein kinase A regulates growth, sporulation, and pigment formation in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15), 4923-33.
- Grosse, V. & Krappmann, S., 2008. The asexual pathogen *Aspergillus fumigatus* expresses functional determinants of *Aspergillus nidulans* sexual development. *Eukaryotic Cell*, 7(10), 1724-32.
- Hall, R.A., Premont, R.T. & Lefkowitz, R.J., 1999. Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol*, 145(5), 927-32.
- Han, K.H., Seo, J.A. & Yu, J.H., 2004a. A putative G protein-coupled receptor negatively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 51(5), 1333-45.
- Han, K.H., Seo, J.A. & Yu, J.H., 2004b. Regulators of G-protein signalling in *Aspergillus nidulans*: RgsA downregulates stress response and stimulates asexual sporulation through attenuation of GanB (Galpha) signalling. *Mol Microbiol*, 53(2), 529-40.
- Hashikawa, N., Yamamoto, N. & Sakurai, H., 2007. Different mechanisms are involved in the transcriptional activation by yeast heat shock transcription factor through two different types of heat shock elements. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(14), 10333-40.
- Hemenway, C.S. & Heitman, J., 1999. Calcineurin. Structure, function, and inhibition. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 30(1), 115-51.
- Hepworth, S.R., Friesen, H. & Segall, J., 1998. NDT80 and the meiotic recombination checkpoint regulate expression of middle sporulation-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 18(10), 5750-61.
- Herrmann, M., Sprote, P. & Brakhage, A.A., 2006. Protein kinase C (PkcA) of *Aspergillus nidulans* is involved in penicillin production. *Appl Environ Microbiol*, 72(4), 2957-70.
- Hicks, J.K. et al., 2004. Cyclic AMP-dependent protein kinase catalytic subunits have divergent roles in virulence factor production in two varieties of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 3(1), 14-26.
- Hicks, J.K. et al., 1997. *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G alpha protein-dependent signaling pathway. *Embo J*, 16(16), 4916-23.
- Howard, R.J. et al., 1991. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(24), 11281-4.
- Izawa, S. et al., 1999. Thioredoxin deficiency causes the constitutive activation of Yap1, an AP-1-like transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(40), 28459-65.
- Katz, M.E., Gray, K. & Cheetham, B.F., 2006. The *Aspergillus nidulans* xprG (phoG) gene encodes a putative transcriptional activator involved in the response to nutrient limitation. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 43(3), 190-9.
- Klengel, T. et al., 2005. Fungal adenylyl cyclase integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence. *Current Biology: CB*, 15(22), 2021-6.
- Kraakman, L. et al., 1999. A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol Microbiol*, 32(5), 1002-12.

- Krappmann, S., Sasse, C. & Braus, G.H., 2006. Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end-joining-deficient genetic background. *Eukaryot Cell*, 5(1), 212-5.
- Kubodera, T., Yamashita, N. & Nishimura, A., 2000. Pyrithiamine resistance gene (ptrA) of *Aspergillus oryzae*: cloning, characterization and application as a dominant selectable marker for transformation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(7), 1416-21.
- Kulkarni, R.D. et al., 2005. Novel G-protein-coupled receptor-like proteins in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Genome Biol*, 6(3), R24.
- Lafon, A. et al., 2006. G-protein and cAMP-mediated signaling in aspergilli: a genomic perspective. *Fungal Genet Biol*, 43(7), 490-502.
- Lafon, A. et al., 2005. The heterotrimeric G-protein GanB(alpha)-SfaD(beta)-GpgA(gamma) is a carbon source sensor involved in early cAMP-dependent germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 171(1), 71-80.
- Latgé, J.P., 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2), 310-50.
- Lemaire, K. et al., 2004. Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*, 16(2), 293-9.
- Lessing, F. et al., 2007. The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryotic Cell*, 6(12), 2290-302.
- Li, L. & Borkovich, K.A., 2006. GPR-4 is a predicted G-protein-coupled receptor required for carbon source-dependent asexual growth and development in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*, 5(8), 1287-300.
- Liebmann, B. et al., 2003. cAMP signaling in *Aspergillus fumigatus* is involved in the regulation of the virulence gene pksP and in defense against killing by macrophages. *Mol Genet Genomics*, 269(3), 420-35.
- Liebmann, B. et al., 2004. The cyclic AMP-dependent protein kinase a network regulates development and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*, 72(9), 5193-203.
- Lin, X., Momany, C. & Momany, M., 2003. SwoHp, a nucleoside diphosphate kinase, is essential in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 2(6), 1169-77.
- Llobell, A. et al., 1988. Glutathione reductase directly mediates the stimulation of yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase by GSSG. *The Biochemical Journal*, 249(1), 293-6.
- Luttrell, L.M., 2008. Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Molecular Biotechnology*, 39(3), 239-64.
- Mah, J.H. & Yu, J.H., 2006. Upstream and downstream regulation of asexual development in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell*, 5(10), 1585-95.
- Maidan, M.M. et al., 2005. The G protein-coupled receptor Gpr1 and the Galpha protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 16(4), 1971-86.
- Maiya, S. et al., 2007. Identification of a hybrid PKS/NRPS required for pseurotin A biosynthesis in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 8(14), 1736-43.
- Mannhaupt, G. et al., 1999. Rpn4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found

- upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Letters*, 450(1-2), 27-34.
- Matsumoto, K., Uno, I. & Ishikawa, T., 1984. Identification of the structural gene and nonsense alleles for adenylyl cyclase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 157(1), 277-82.
- Mazur, P. et al., 1991. Structure and synthesis of sporogenic psi factors from *Aspergillus nidulans*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (20), 1486-1487.
- Mogensen, E.G. et al., 2006. *Cryptococcus neoformans* senses CO₂ through the carbonic anhydrase Can2 and the adenylyl cyclase Cac1. *Eukaryot Cell*, 5(1), 103-11.
- Momany, M., Westfall, P.J. & Abramowsky, G., 1999. *Aspergillus nidulans* two mutants show defects in polarity establishment, polarity maintenance and hyphal morphogenesis. *Genetics*, 151(2), 557-67.
- Mullins, J., Harvey, R. & Seaton, A., 1976. Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres). *Clinical Allergy*, 6(3), 209-17.
- Ni, M. et al., 2005. The pkaB gene encoding the secondary protein kinase A catalytic subunit has a synthetic lethal interaction with pkaA and plays overlapping and opposite roles in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*, 4(8), 1465-76.
- Nierman, W.C. et al., 2005. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 438(7071), 1151-6.
- Nikawa, J., Sass, P. & Wigler, M., 1987. Cloning and characterization of the low-affinity cyclic AMP phosphodiesterase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 7(10), 3629-36.
- Nobles, M., Benians, A. & Tinker, A., 2005. Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51), 18706-11.
- Noverr, M.C. et al., 2001. Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. *Infect Immun*, 69(5), 2957-63.
- Noverr, M.C. et al., 2003. Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. *Infection and Immunity*, 71(3), 1538-47.
- Olsson, I. et al., 2002. Organic disulfides as a means to generate streak-free two-dimensional maps with narrow range basic immobilized pH gradient strips as first dimension. *Proteomics*, 2(11), 1630-2.
- Paoletti, M. et al., 2005. Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Current Biology: CB*, 15(13), 1242-8.
- Philip, B. & Levin, D.E., 2001. Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Molecular and Cellular Biology*, 21(1), 271-80.
- Popolo, L., Gualtieri, T. & Ragni, E., 2001. The yeast cell-wall salvage pathway. *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 39 Suppl 1, 111-21.
- Posas, F. & Saito, H., 1998. Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *The EMBO Journal*, 17(5), 1385-94.
- Posas, F. & Saito, H., 1997. Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5319), 1702-5.
- Pöggeler, S., 2002. Genomic evidence for mating abilities in the asexual pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Current Genetics*, 42(3), 153-60.

- Pyrzak, W., Miller, K.Y. & Miller, B.L., 2008. Mating type protein Mat1-2 from asexual *Aspergillus fumigatus* drives sexual reproduction in fertile *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 7(6), 1029-40.
- Rolland, F. et al., 2000. Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Molecular Microbiology*, 38(2), 348-58.
- Rosen, S., Yu, J.H. & Adams, T.H., 1999. The *Aspergillus nidulans* *sfaD* gene encodes a G protein beta subunit that is required for normal growth and repression of sporulation. *Embo J*, 18(20), 5592-600.
- Rüchel, R. & Reichard, U., 1999. Pathogenesis and clinical presentation of aspergillosis. *Contributions to Microbiology*, 2, 21-43.
- Ryckeboer, J. et al., 2003. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *Journal of Applied Microbiology*, 94(1), 127-37.
- Sabra, R. & Branch, R.A., 1991. Mechanisms of amphotericin B-induced decrease in glomerular filtration rate in rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(12), 2509-14.
- Salin, H. et al., 2008. Structure and properties of transcriptional networks driving selenite stress response in yeasts. *BMC Genomics*, 9, 333.
- Sanz, M.A. et al., 2006. Epidemiology of invasive fungal infections due to *Aspergillus* spp. and Zygomycetes.
- Sass, P. et al., 1986. Cloning and characterization of the high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(24), 9303-7.
- Schiöth, H.B. & Fredriksson, R., 2005. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *General and Comparative Endocrinology*, 142(1-2), 94-101.
- Schmid, J. & Harold, F.M., 1988. Dual roles for calcium ions in apical growth of *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology*, 134(9), 2623-31.
- Schumacher, J. et al., 2008. The G-beta subunit BCG1, the phospholipase C (BcPLC1) and the calcineurin phosphatase co-ordinately regulate gene expression in the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Microbiology*, 67(5), 1027-1050.
- Semighini, C.P. & Harris, S.D., 2008. Regulation of apical dominance in *Aspergillus nidulans* hyphae by reactive oxygen species. *Genetics*, 179(4), 1919-32.
- Seo, J.A., Han, K.H. & Yu, J.H., 2005. Multiple roles of a heterotrimeric G-protein gamma-subunit in governing growth and development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 171(1), 81-9.
- Seo, J.A., Han, K.H. & Yu, J.H., 2004. The *gprA* and *gprB* genes encode putative G protein-coupled receptors required for self-fertilization in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 53(6), 1611-23.
- Seo, J.A., Proctor, R.H. & Plattner, R.D., 2001. Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 34(3), 155-65.
- Shaw, B.D. & Hoch, H.C., 2000. Ca²⁺ regulation of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospore germination and appressorium Formation. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 31(1), 43-53.
- Shaw, B.D., Momany, C. & Momany, M., 2002. *Aspergillus nidulans* *swoF* encodes an N-myristoyl transferase. *Eukaryotic Cell*, 1(2), 241-8.

- Shaw, B.D. & Momany, M., 2002. *Aspergillus nidulans* polarity mutant *swoA* is complemented by protein O-mannosyltransferase *pmtA*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 37(3), 263-70.
- Shimizu, K. & Keller, N.P., 2001. Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 157(2), 591-600.
- da Silva Ferreira, M.E. et al., 2006. The *akuB*(KU80) mutant deficient for nonhomologous end joining is a powerful tool for analyzing pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell*, 5(1), 207-11.
- da Silva Ferreira, M.E. et al., 2007. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* calcineurin. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 44(3), 219-30.
- Soriani, F.M. et al., 2008. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA. *Molecular Microbiology*, 67(6), 1274-91.
- Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98(3), 503-17.
- Spellig, T., Bottin, A. & Kahmann, R., 1996. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, 252(5), 503-9.
- Steinbach, W.J. et al., 2006. Calcineurin controls growth, morphology, and pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell*, 5(7), 1091-103.
- Steinbach, W.J. & Stevens, D.A., 2003. Review of newer antifungal and immunomodulatory strategies for invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 37 Suppl 3, S157-87.
- Sunnarborg, S.W. et al., 2001. Expression of the yeast glycogen phosphorylase gene is regulated by stress-response elements and by the HOG MAP kinase pathway. *Yeast (Chichester, England)*, 18(16), 1505-14.
- Truman, A.W. et al., 2007. In the yeast heat shock response, Hsf1-directed induction of Hsp90 facilitates the activation of the Slt2 (Mpk1) mitogen-activated protein kinase required for cell integrity. *Eukaryotic Cell*, 6(4), 744-52.
- Tekaia, F. & Latgé, J., 2005. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Current Opinion in Microbiology*, 8(4), 385-92.
- Thevelein, J.M., 1994. Signal transduction in yeast. *Yeast (Chichester, England)*, 10(13), 1753-90.
- Thevelein, J.M. et al., 2005. Nutrient sensing systems for rapid activation of the protein kinase A pathway in yeast. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 1), 253-6.
- Thines, E. et al., 1997. Signal transduction leading to appressorium formation in germinating conidia of *Magnaporthe grisea* effects of second messengers diacylglycerols, ceramides and sphingomyelin. *FEMS Microbiology Letters*, 156(1), 91-94.
- Thon, M. et al., 2007. The thioredoxin system of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: impact on development and oxidative stress response. *J Biol Chem*, 282(37), 27259-69.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J.D. et al., 1987. Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 7(4), 1371-7.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M. & Wigler, M., 1987. Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell*, 50(2), 277-87.

- Tsitsigiannis, D.I. et al., 2005. Aspergillus cyclooxygenase-like enzymes are associated with prostaglandin production and virulence. *Infect Immun*, 73(8), 4548-59.
- Tsitsigiannis, D.I., Kowieski, T.M. et al., 2005. Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 6), 1809-21.
- Tsitsigiannis, D.I., Kunze, S. et al., 2005. Aspergillus infection inhibits the expression of peanut 13S-HPODE-forming seed lipoxygenases. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 18(10), 1081-9.
- Tsitsigiannis, D.I., Zarnowski, R. & Keller, N.P., 2004. The lipid body protein, PpoA, coordinates sexual and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 11344-53.
- Valiante, V. et al., 2008. The mitogen-activated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 45(5), 618-27.
- Versele, M., de Winde, J.H. & Thevelein, J.M., 1999. A novel regulator of G protein signalling in yeast, Rgs2, downregulates glucose-activation of the cAMP pathway through direct inhibition of Gpa2. *The EMBO Journal*, 18(20), 5577-91.
- Versele, M., Lemaire, K. & Thevelein, J.M., 2001. Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems. *EMBO Rep*, 2(7), 574-9.
- Ward, M.P. & Garrett, S., 1994. Suppression of a yeast cyclic AMP-dependent protein kinase defect by overexpression of SOK1, a yeast gene exhibiting sequence similarity to a developmentally regulated mouse gene. *Molecular and Cellular Biology*, 14(9), 5619-27.
- Whiteway, M. et al., 1989. The STE4 and STE18 genes of yeast encode potential beta and gamma subunits of the mating factor receptor-coupled G protein. *Cell*, 56(3), 467-77.
- Xue, C. et al., 2006. G protein-coupled receptor Gpr4 senses amino acids and activates the cAMP-PKA pathway in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Biol Cell*, 17(2), 667-79.
- Xue, Y., Battle, M. & Hirsch, J.P., 1998. GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p Galpha subunit and functions in a Ras-independent pathway. *Embo J*, 17(7), 1996-2007.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J., 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33(1), 103-19.
- Yu, J.H., Rosen, S. & Adams, T.H., 1999. Extragenic suppressors of loss-of-function mutations in the aspergillus FlbA regulator of G-protein signaling domain protein. *Genetics*, 151(1), 97-105.
- Yun, C.W. et al., 1998. Gpr1p, a putative G-protein coupled receptor, regulates glucose-dependent cellular cAMP level in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 252(1), 29-33.
- Zhao, W. et al., 2006. Deletion of the regulatory subunit of protein kinase A in *Aspergillus fumigatus* alters morphology, sensitivity to oxidative damage, and virulence. *Infect Immun*, 74(8), 4865-74.

F. Zusammenfassung

Aspergillus fumigatus ist der Hauptverursacher von Aspergillosen, die die stärkste Ausprägung in immunsupprimierten Individuen in Form von der invasiven Aspergillosen haben können. Die komplexen ökologischen Nischen, die durch diesen Deuteromyceten besiedelt werden können, erfordern einen auf externe Reize spezifisch reagierenden Metabolismus. Zwar sind eine Vielzahl der konservierten Signalwege in *A. fumigatus*, wie die cAMP-PKA- oder die MAP-Kinase-Signalkaskade identifiziert, dafür ist nur wenig über mögliche Signale und deren spezifische Sensoren bekannt.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal ein umfassendes Set an Rezeptoren, die typische Charakteristika von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aufweisen, in *A. fumigatus* identifiziert und klassifiziert werden. Hierzu gehören putative Rezeptoren für Nährstoffe, aber auch für Signalmoleküle wie Oxylipine. Um die zelluläre Funktion näher untersuchen zu können, wurden einzelne Vertreter der Rezeptoren-Gruppen in *A. fumigatus* deletiert. In *S. cerevisiae* reguliert der Glucoserezeptor Gpr1p die Aktivität der Proteinkinase A über das G Protein Gpa2p, welches ortholog zu GPAB aus *A. fumigatus* ist. Daher wurden die Deletionsmutanten, GprC und GprD, als Orthologe zu Gpr1p, näher untersucht. Die Deletionen führten zu starken phänotypischen Veränderungen, so war das Hyphenwachstum verlangsamt, die Germination retardiert und Hyphen waren stärker verzweigt. Ein Zusammenhang mit verschiedenen Kohlenstoffquellen, die als mögliche Liganden dienen könnten, konnte nicht bestätigt werden. Die Sensitivität gegenüber Umweltstress wie Hitze oder reaktiven Sauerstoffspezies (Wasserstoffperoxid) nahm zu, wobei die Ausprägung des Phänotyps in Abhängigkeit der Temperatur verstärkt oder gemildert werden konnte.

Eine kombinierte Proteom-/Transkriptomanalyse gab einen tieferen Einblick in die durch die Rezeptoren GprC und GprD beeinflussten zellulären Systeme. So konnte gezeigt werden, dass Prozesse des primären Stoffwechsels in den Mutanten dereguliert sind, da essentielle Transkripte/Proteine der Glycolyse herunter reguliert sind. Im Gegensatz dazu steht, dass in beiden Mutanten bis zu fünf Sekundärmetabolismus-Gencluster, deren Syntheseprodukte nur teilweise bekannt sind, herauf reguliert waren. Erste Hinweise deuten auf eine Beteiligung der Proteinphosphatase Calcineurin in die durch GprC bzw. GprD regulierten Prozesse.

Da die Deletionsmutanten in einem Mausinfektionsmodell eine stark attenuierte Virulenz aufwiesen, liegt es nahe darüber zu spekulieren, ob durch die Gabe von GprC/GprD-spezifischen Liganden bzw. Antagonisten nicht auch das Wachstum von *A. fumigatus in vivo* reduziert werden könnte.

Abstract

Aspergillus fumigatus is the most prevalent airborne fungal pathogen being able to cause life threatening diseases in immunocompromised individuals. The deuteromycete normally lives on compost or hay but is also able to colonise such hostile ecological niches as the human lung. In order to survive, this organism needs to react specifically to a multitude of external stimuli or changes. Although work has been carried out in *A. fumigatus* dealing with the cAMP-PKA or MAP kinase signal cascades, very little is known about the specific stimuli and the corresponding receptors activating these cascades.

In this study a comprehensive set of putative receptors, showing the typical characteristics of G protein-coupled receptors, was identified and classified in *A. fumigatus*. Amongst others, putative receptors for carbon sources or small signal molecules like oxylipins were detected in the genome. To further characterise their cellular functions, selected representatives of the groups were deleted. As the *Saccharomyces cerevisiae* glucose receptor Gpr1p regulates PKA activity via the G protein Gpa2p, the orthologous proteins, GprC and GprD, were chosen for further experiments. The deletion mutants exhibited drastic growth defects as the hyphal extensions were reduced, the germination was retarded and hyphae showed elevated levels of branching. Based on the data presented here, a connection of the phenotype and sugars as possible ligands is unlikely. The sensitivity towards heat or environmental stress caused by reactive oxygen species (hydrogen peroxide) was increased. Furthermore, the growth defect was found to be temperature dependent as it could be in- or decreased by elevating or reducing the incubation temperature, respectively.

A combined approach of proteome and transcriptome analyses allowed a deeper insight into cellular processes affected by the deletion of the GprC and GprD receptor. It could be shown that transcripts/proteins of the primary metabolism, e.g. for glycolysis, were down regulated in the mutants. On the other hand, secondary metabolism seemed to be repressed by the receptors as in the strains Δ GprC and Δ GprD up to five secondary metabolism gene clusters, partially with unknown products, were upregulated. A possible role of the protein phosphatase calcineurin in cellular processes affected by GprC/GprD is postulated.

The deletion mutants displayed an attenuation of virulence in a low-dose murine infection model. Therefore, it is tempting to speculate whether the addition of specific ligands or antagonists could also reduce the growth of *A. fumigatus in vivo*.

Eigenständigkeitserklärung

Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt. Die vorliegende Dissertation habe ich selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen, persönliche Mitteilungen und Hilfsmittel benutzt.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials haben mich die in der Danksagung meiner Dissertation genannten Personen unterstützt. Personen, die bei der Anfertigung der Publikationen beteiligt waren, sind in der Publikationsliste angegeben.

Ich habe die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ferner habe ich nicht versucht, diese Arbeit oder eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation einzureichen.

Jena, 23. Oktober 2008

.....
Alexander Gehrke

Schriftliche Veröffentlichungen

Gehrke A., T. Heinekamp, und A. A. Brakhage. Functional characterisation of heptahelical receptors GprC and GprD in *Aspergillus fumigatus*. submitted

Behnsen J., A. Hartmann, J. Schmalzer, A. Gehrke, A. A. Brakhage, und P. F. Zipfel. 2008. The opportunistic human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* evades the host complement system. *Infect Immun* 76:820-7.

Brakhage A. A., P. Spröte, Q. Al-Abdallah, A. Gehrke, H. Plattner, und A. Tüncher. 2004. Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 88:45-90.

Grosse C., T. Heinekamp, O. Kniemeyer, A. Gehrke, und A. A. Brakhage. 2008. Protein kinase A regulates growth, sporulation, and pigment formation in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* 74:4923-33.

Tüncher A., P. Spröte, A. Gehrke, und A. A. Brakhage. 2005. The CCAAT-binding complex of eukaryotes: evolution of a second NLS in the HapB subunit of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* despite functional conservation at the molecular level between yeast, *A. nidulans* and human. *J Mol Biol* 352:517-33.

Tagungsbeiträge

Gehrke A., T. Heinekamp, A. A. Brakhage (2008) Heptahelical receptors GprC and GprD affect development, morphogenesis and the stress response in *Aspergillus fumigatus*
„XX. International Congress of Genetics“, Berlin

Gehrke A., T. Heinekamp T., A. A. Brakhage (2007) Putative G protein-coupled receptors GprC and GprD are involved in development and morphogenesis in *Aspergillus fumigatus*
„Second FEBS Advanced Lecture Course: Human Fungal Pathogens“, La Colle sur Loup, France

Heinekamp T., A. Gehrke, A. A. Brakhage (2007) Putative G protein-coupled receptors GprC and GprD are involved in development and morphogenesis in *Aspergillus fumigatus*
„XXIV Fungal Genetics Conference“, Asilomar, CA, USA

Gehrke A., N. Möhle, T. Heinekamp, A. A. Brakhage (2006) Characterisation of cAMP signal transduction in *Aspergillus fumigatus*
„8th European Conference on Fungal Genetics“, Wien, Österreich

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt...

... Prof. Dr. Axel Brakhage für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe an diesem überaus interessanten Thema arbeiten zu können, welches mich sicherlich über die Doktorarbeit hinaus beschäftigen wird. Für irgendwas müssen diese ganzen Rezeptoren doch gut sein. Weiterhin danke ich ihm für sein fortwährendes, stets von Optimismus geprägtes Interesse an dem Projekt, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die mir gebotene experimentelle Freiheit.

... der Abteilung MPM für die große Hilfe bei der Durchführung der Tierversuchsreihen und der Abteilung BMC für die Unterstützung bei der Spot-Identifikation.

... den wundervollen Mitarbeitern unserer Abteilung (die Bröckchen zähle ich einfach noch mal hier zu). Seien es (ehemalige) Bürokollegen, Laborvertraute oder Lauf- und Leidensgenossen, ihr werdet über die Zeit der Promotion hinaus mit all euren kleinen und großen Beiträgen unvergesslich bleiben. Einzelne hervorzuheben, täte anderen Unrecht. Ich danke euch.

... allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie der Leibniz-Universität Hannover. Möge die Lücke, die Dr. Plattner hinterliess, nicht zu groß sein.

... meinen Freunden hier in Jena und überall sonst. Danke, dass ihr es mit mir ausgehalten habt.

... meinen Eltern und meiner Familie für „ihr-wisst-schon-was“.

Inga, Dir danke ich für so vieles in den letzten sieben Jahren, vor allem für das schönste „Ja“, das je zu mir gesagt wurde.

Anhang

Tabelle: Daten zur Evaluierung der FEBIT-Oligonukleotide (Januar 2008)

Mindestens zweifach im Wildtyp herauf reguliert		Locus
XM_745377	6-phosphofructo-2-kinase 1	AFUA_1G07220
XM_747617	conserved hypothetical protein	AFUA_1G13400
XM_747652	C2H2 transcription factor, Rpn4, putative	AFUA_1G13750
XM_747707	Fasciclin domain family protein	AFUA_1G14300
XM_747992	TfdA family taurine dioxygenase, putative	AFUA_1G17170
XM_748009	CP2 transcription factor	AFUA_1G17350
XM_744617	dienelactone hydrolase	AFUA_2G05810
XM_750077	orotidine 5'-phosphate decarboxylase PyrG	AFUA_2G08360
XM_750194	DUF833 domain protein	AFUA_2G09530
XM_750268	ketoreductase partial mRNA	AFUA_2G10280
XM_751037	integral membrane protein	AFUA_2G17930
XM_743335	tyrosinase	AFUA_3G01070
XM_749935	C6 transcription factor, Fcr1, putative	AFUA_3G05760
XM_749849	40S ribosomal protein S27	AFUA_3G06640
XM_749309	RING finger domain protein, putative	AFUA_3G12190
XM_749254	copper resistance-associated P-type ATPase	AFUA_3G12740
XM_749086	Pyridoxal-phosphate dependent enzyme	AFUA_3G14470
XM_749079	heat shock protein Hsp30/Hsp42, putative	AFUA_3G14540
XM_746861	short chain dehydrogenase	AFUA_4G08710
XM_746611	carbonic anhydrase Nce103	AFUA_4G11250
XM_746400	conserved hypothetical protein	AFUA_4G13380
XM_746361	glycosyl hydrolase	AFUA_4G13770
XM_748916	alcohol dehydrogenase	AFUA_5G06240
XM_748793	conserved hypothetical protein	AFUA_5G07480
XM_748613	CipC-like antibiotic response protein	AFUA_5G09330
XM_748588	conidial hydrophobin Hyp1/RodA	AFUA_5G09580
XM_748521	heat shock protein Hsp20/Hsp26, putative	AFUA_5G10270
XM_748096	conserved hypothetical protein	AFUA_5G14680
XM_745446	heat shock protein Hsp30-like, putative	AFUA_6G06470
XM_745804	conserved hypothetical protein	AFUA_6G10080
XM_741738	aldehyde dehydrogenase	AFUA_7G01000
XM_741737	alcohol dehydrogenase	AFUA_7G01010
XM_741860	extracellular lipase	AFUA_8G02530
Mindestens zweifach im Stamm ΔGprC herauf reguliert		
XM_747569	glycogen phosphorylase GlpV/Gph1, putative	AFUA_1G12920
XM_744160	1,3-beta-glucanosyltransferase Gel1	AFUA_2G01170
XM_750229	NDT80 / PhoG like DNA-binding family protein	AFUA_2G09890
XM_743263	glycosyl hydrolase	AFUA_3G00340
XM_743296	copper amine oxidase	AFUA_3G00680
XM_743343	GPI anchored cell wall protein, putative	AFUA_3G01150
XM_743378	integral membrane protein	AFUA_3G01500
XM_743457	mycelial catalase Cat1	AFUA_3G02270
XM_743588	conserved hypothetical protein	AFUA_3G03610
XM_749557	extracellular thaumatin domain protein	AFUA_3G09690
XM_741206	ankyrin repeat protein	AFUA_4G01580
XM_741438	conserved hypothetical protein	AFUA_4G03440

XM_741561	FGGY-family carbohydrate kinase, putative	AFUA_4G04680
XM_743235	cytochrome P450 oxidoreductase/alkane hydroxylase	AFUA_5G00120
XM_743234	capsule polysaccharide biosynthesis protein	AFUA_5G00130
XM_743107	conserved hypothetical protein	AFUA_5G01420
XM_743065	DUF455 domain protein	AFUA_5G01840
XM_743057	GPI anchored protein	AFUA_5G01920
XM_743017	conserved hypothetical protein	AFUA_5G02320
XM_743004	farnesyl-pyrophosphate synthetase	AFUA_5G02450
XM_742897	thioredoxin reductase	AFUA_5G03540
XM_726395	conserved hypothetical protein	AFUA_6G00680
XM_726394	conserved hypothetical protein	AFUA_6G00690
XM_742722	2-dehydropantoate 2-reductase, putative	AFUA_6G02620
XM_742641	C6 finger domain protein	AFUA_6G03430
XM_742555	conserved hypothetical protein	AFUA_6G04300
XM_742468	C2H2 transcription factor, Azf1, putative	AFUA_6G05160
XM_742458	transferase, Gpi7	AFUA_6G05260
XM_742450	tryptophanyl-tRNA synthetase, putative	AFUA_6G05340
XM_745635	conserved hypothetical protein	AFUA_6G08390
XM_001481415	LysM domain protein	AFUA_6G09320
XM_745728	SRF-type transcription factor family protein	AFUA_6G09335
XM_746215	glucoligosaccharide oxidase, putative	AFUA_6G14340
XM_741794	hypothetical protein	AFUA_7G00420
XM_741779	conserved hypothetical protein	AFUA_7G00580
XM_741708	C6 transcription factor	AFUA_7G01310
XM_741702	thiosulfate sulfurtransferase, putative	AFUA_7G01370
XM_741697	isoleucyl-tRNA synthetase	AFUA_7G01420
XM_741678	integral membrane protein	AFUA_7G01610
XM_741652	PHD finger domain protein	AFUA_7G01870
XM_741647	DNA-dependent RNA polymerase II RPB140	AFUA_7G01920
XM_741646	GTP-binding protein EsdC	AFUA_7G01930
XM_741621	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	AFUA_7G02180
XM_741612	TRAPP complex component Bet3, putative	AFUA_7G02270
XM_741606	conserved hypothetical protein	AFUA_7G02320
XM_741590	mitochondrial molecular chaperone, ATP12	AFUA_7G02490
XM_744040	cell-cycle checkpoint protein kinase	AFUA_7G03750
XM_744032	DNA repair protein Rad7, protein	AFUA_7G03830
XM_743957	Rho guanyl nucleotide exchange factor	AFUA_7G04600
XM_743952	proteasome component Pre3	AFUA_7G04650
XM_743944	siderochrome-iron transporter, putative	AFUA_7G04730
XM_743869	electron transfer flavoprotein alpha subunit	AFUA_7G05470
XM_743839	conserved hypothetical protein	AFUA_7G05780
XM_743836	ribonucleoprotein	AFUA_7G05810
XM_743824	metallopeptidase MepB	AFUA_7G05930
XM_743778	MFS maltose permease MalP	AFUA_7G06390
XM_743756	integral membrane protein Pth11-like	AFUA_7G06620
XM_743753	alpha/beta hydrolase	AFUA_7G06650
XM_742088	phytanoyl-CoA dioxygenase family protein	AFUA_8G00230
XM_742086	dimethylallyl tryptophan synthase, putative	AFUA_8G00250
XM_742073	DltD N-terminal domain protein	AFUA_8G00380
XM_742072	O-methyltransferase	AFUA_8G00390
XM_742070	methionine aminopeptidase, type II, putative	AFUA_8G00410
XM_742069	C6 finger transcription factor, putative	AFUA_8G00420
XM_742060	integral membrane protein	AFUA_8G00520

XM_742059	alpha/beta hydrolase	AFUA_8G00530
XM_742058	hybrid PKS-NRPS enzyme	AFUA_8G00540
XM_742057	methyltransferase SirN-like, putative	AFUA_8G00550
XM_741901	conserved hypothetical protein	AFUA_8G02120
XM_742201	COP9 signalosome subunit 1, CsnA, putative	AFUA_8G04880
XM_742214	beta-N-acetylhexosaminidase NagA, putative	AFUA_8G05020
XM_742422	conserved hypothetical protein	AFUA_8G07170
XM_743779	maltase partial mRNA	AFUA_7G06380

Tabelle: Vollständige Liste der differentiell regulierten Transkripte, Studie Δ GprC / Wildtyp (April 2008) sortiert nach „Fold change“

FC ΔGprC/ wt	Accession #	Description	Afu-Locus
0,09	XM_749026	flavin-binding monooxygenase, putative	AFUA_3G15050
0,1	XM_742633	flavin containing polyamine oxidase	AFUA_6G03510
0,14	XM_001481458	PTH11-like integral membrane protein	AFUA_5G11245
0,15	XM_748083	pyruvate decarboxylase	AFUA_5G14810
0,17	XM_743512	ankyrin repeat protein	AFUA_3G02830
0,18	XM_742021	UDP-glucose dehydrogenase Ugd1, putative	AFUA_8G00920
0,18	XM_747496	NADH oxidase partial mRNA	AFUA_1G12210
0,19	XM_742638	conserved hypothetical protein	AFUA_6G03460
0,2	XM_743662	hypothetical protein	AFUA_7G08600
0,2	XM_744617	dienelactone hydrolase	AFUA_2G05810
0,2	XM_746800	extracellular dipeptidyl-peptidase Dpp4	AFUA_4G09320
0,21	XM_749077	MFS multidrug transporter	AFUA_3G14560
0,24	XM_749450	phosphoketolase	AFUA_3G10760
0,25	XM_001481557	DEAD/DEAH box helicase	AFUA_3G06922
0,26	XM_001481650	alpha-1,3-glucanase/mutanase, putative	AFUA_1G03352
0,26	XM_741860	extracellular lipase	AFUA_8G02530
0,28	XM_743078	cytochrome P450 phenylacetate 2-hydroxylase	AFUA_5G01710
0,29	XM_744966	mitochondrial integral membrane protein	AFUA_1G03090
0,29	XM_741893	proline permease	AFUA_8G02200
0,3	XM_745628	conserved hypothetical protein	AFUA_6G08320
0,3	XM_745158	sulfate transporter	AFUA_1G05020
0,3	XM_742615	sodium P-type ATPase	AFUA_6G03690
0,31	XM_746384	potassium uptake transporter, putative	AFUA_4G13540
0,31	XM_743937	conserved hypothetical protein	AFUA_7G04800
0,31	XM_743104	NADH-dependent flavin oxidoreductase	AFUA_5G01450
0,31	XM_744306	hypothetical protein	AFUA_2G02640
0,32	XM_747005	cAMP-mediated signaling protein Sok1	AFUA_4G07280
0,32	XM_744236	conserved hypothetical protein	AFUA_2G01940
0,32	XM_745705	conserved hypothetical protein	AFUA_6G09100
0,33	XM_745901	amino acid permease	AFUA_6G11100
0,33	XM_745377	6-phosphofructo-2-kinase 1	AFUA_1G07220
0,33	XM_749633	tubulin-specific chaperone c, putative	AFUA_3G08900
0,34	XM_748843	conserved hypothetical protein	AFUA_5G06980
0,34	XM_747310	MFS multidrug transporter	AFUA_1G10370
0,35	XM_001481603	WD repeat protein	AFUA_2G04360
0,35	XM_746826	phosphatidate cytidylyltransferase, putative	AFUA_4G09060
0,36	XM_748550	67 kDa myosin-cross-reactive antigen family protein	AFUA_5G09970
0,36	XM_743663	hypothetical protein	AFUA_7G08590
0,36	XM_751047	catalase partial mRNA	AFUA_2G18030

0,36	XM_747652	C2H2 transcription factor, Rpn4, putative	AFUA_1G13750
0,37	XM_741516	hypothetical protein	AFUA_4G04230
0,37	XM_750791	TPR domain protein	AFUA_2G15490
0,37	XM_748253	conserved hypothetical protein	AFUA_5G13080
0,38	XM_744393	pheromone processing carboxypeptidase, Sxa2	AFUA_2G03510
0,38	XM_001481669	conserved hypothetical protein	AFUA_1G10012
0,38	XM_749909	glutaryl-CoA dehydrogenase, putative	AFUA_3G06040
0,38	XM_746314	hypothetical protein	AFUA_4G14250
0,38	XM_745899	DEAD box RNA helicase, Hca4, putative	AFUA_6G11070
0,38	XM_742713	lipase	AFUA_6G02710
0,39	XM_742034	conserved hypothetical protein	AFUA_8G00780
0,39	XM_749318	trehalose synthase, Ccg-9, putative	AFUA_3G12100
0,39	XM_749148	PH domain protein	AFUA_3G13830
0,39	XM_750907	acyl-CoA dehydrogenase	AFUA_2G16630
0,39	XM_742493	NAD-dependent formate dehydrogenase AciA/Fdh	AFUA_6G04920
0,4	XM_750529	PtaB protein	AFUA_2G12910
0,4	XM_746332	glycosyl transferase	AFUA_4G14070
0,4	XM_747707	Fasciclin domain family protein	AFUA_1G14300
0,4	XM_746132	glutamate decarboxylase	AFUA_6G13490
0,4	XM_744891	conserved hypothetical protein	AFUA_1G02340
0,4	XM_749252	conserved hypothetical protein	AFUA_3G12760
0,4	XM_748812	NADPH-dependent FMN/FAD containing oxidoreductase	AFUA_5G07290
0,41	XM_743561	nonribosomal peptide synthase SidE	AFUA_3G03350
0,41	XM_746122	FAD dependent oxidoreductase, putative	AFUA_6G13390
0,41	XM_742825	homocysteine synthase CysD	AFUA_5G04250
0,41	XM_741738	aldehyde dehydrogenase	AFUA_7G01000
0,41	XM_742125	DUF895 domain membrane protein	AFUA_8G04110
0,41	XM_743266	phosphoketolase	AFUA_3G00370
0,42	XM_750651	sulfur metabolite repression control protein SconB	AFUA_2G14110
0,42	XM_743599	conserved hypothetical protein	AFUA_3G03720
0,42	XM_742951	aromatic amino acid aminotransferase	AFUA_5G02990
0,42	XM_741490	C6 transcription factor Ctf1A, putative	AFUA_4G03960
0,42	XM_748266	arylsulfatase	AFUA_5G12940
0,42	XM_748872	4-aminobutyrate transaminase GatA	AFUA_5G06680
0,43	XM_747295	conserved hypothetical protein	AFUA_1G10220
0,43	XM_750808	aldehyde dehydrogenase family protein	AFUA_2G15660
0,43	XM_742294	FAD dependent oxidoreductase superfamily	AFUA_8G05850
0,43	XM_743700	hypothetical protein	AFUA_7G08220
0,43	XM_743632	conserved hypothetical protein	AFUA_3G04050
0,43	XM_745910	protein kinase, VPS15	AFUA_6G11190
0,43	XM_742311	glutamate decarboxylase	AFUA_8G06020
0,44	XM_746567	Leucine Rich Repeat domain protein	AFUA_4G11700
0,44	XM_743858	phospholipase PldA	AFUA_7G05580
0,44	XM_749076	histidine acid phosphatase, putative	AFUA_3G14570
0,44	XM_749419	pyruvate decarboxylase PdcA, putative	AFUA_3G11070
0,44	XM_741494	LysM domain protein	AFUA_4G04000
0,44	XM_744604	conserved hypothetical protein	AFUA_2G05680
0,44	XM_744972	c-14 sterol reductase	AFUA_1G03150
0,44	XM_743910	FAD dependent oxidoreductase, putative	AFUA_7G05070
0,44	XM_742426	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, putative	AFUA_8G07210
0,44	XM_748093	conserved hypothetical protein	AFUA_5G14710
0,45	XM_747317	conserved hypothetical protein	AFUA_1G10440
0,45	XM_745078	small nucleolar ribonucleoprotein complex subunit Utp14, putative	AFUA_1G04240
0,45	XM_747803	heat shock protein Hsp98/Hsp104/ClpA	AFUA_1G15270
0,45	XM_747397	amidohydrolase	AFUA_1G11250
0,45	XM_744927	zinc metalloproteinase	AFUA_1G02700
0,45	XM_746375	PE repeat family protein	AFUA_4G13630
0,45	XM_742637	ABC multidrug transporter	AFUA_6G03470
0,45	XM_748009	CP2 transcription factor	AFUA_1G17350

0,45	XM_741467	dienelactone hydrolase	AFUA_4G03730
0,46	XM_745259	DnaJ domain protein	AFUA_1G06020
0,46	XM_747855	fatty acid hydroxylase	AFUA_1G15820
0,47	XM_746908	raffinose synthase protein Sip1, putative	AFUA_4G08250
0,47	XM_746828	high affinity methionine permease	AFUA_4G09040
0,47	XM_742380	UDP-glucose,sterol transferase, putative	AFUA_8G06750
0,47	XM_749636	conserved hypothetical protein	AFUA_3G08870
0,47	XM_741470	glycine dehydrogenase	AFUA_4G03760
0,47	XM_746468	conserved hypothetical protein	AFUA_4G12710
0,48	XM_742926	pyruvate dehydrogenase kinase, putative	AFUA_5G03240
0,48	XM_750239	conserved hypothetical protein	AFUA_2G09990
0,48	XM_748085	phosphoenolpyruvate synthase, putative	AFUA_5G14790
0,48	XM_743775	NADH-dependent flavin oxidoreductase	AFUA_7G06420
0,48	XM_748190	carboxylesterase	AFUA_5G13710
0,48	XM_745920	conserved hypothetical protein	AFUA_6G11290
0,48	XM_746162	flavin-binding monooxygenase, putative	AFUA_6G13790
0,49	XM_747390	heat shock protein/chaperonin HSP78	AFUA_1G11180
0,49	XM_749840	MFS sugar transporter	AFUA_3G06730
0,49	XM_741842	protein phosphatase type 1 complex subunit Hex2/Reg1	AFUA_8G02720
0,49	XM_744817	deoxyribodipyrimidine photo-lyase Phr1	AFUA_1G01600
0,49	XM_747422	conserved hypothetical protein	AFUA_1G11500
0,49	XM_742547	molecular chaperone, ABC1, putative	AFUA_6G04380
0,49	XM_749311	MFS sugar transporter	AFUA_3G12170
0,5	XM_745640	protoporphyrinogen oxidase, putative	AFUA_6G08440
0,5	XM_750650	kinase activator, Atg 17	AFUA_2G14100
0,5	XM_745654	FKBP-type peptidyl-prolyl isomerase	AFUA_6G08580
0,5	XM_749747	nucleolin protein Nsr1	AFUA_3G07710
0,5	XM_747732	mannosidase MsdS	AFUA_1G14560
0,5	XM_748141	C6 transcription factor	AFUA_5G14230
0,5	XM_742789	conserved hypothetical protein	AFUA_6G01950
0,5	XM_745748	lipase/esterase family protein	AFUA_6G09520
0,5	XM_750759	conserved hypothetical protein	AFUA_2G15170
0,5	XM_001481516	conserved hypothetical protein	AFUA_4G09255
0,5	XM_746010	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein	AFUA_6G12240
0,5	XM_744170	ferric-chelate reductase	AFUA_2G01270
0,5	XM_750048	involucrin repeat protein	AFUA_2G08060
0,5	XM_745351	lipoyltransferase and lipoate-protein ligase	AFUA_1G06950
0,5	XM_747876	conserved hypothetical protein	AFUA_1G16030
0,5	XM_745831	protein required for cell viability	AFUA_6G10360
0,5	XM_749767	conserved hypothetical protein	AFUA_3G07510
1,99	XM_745537	conserved hypothetical protein	AFUA_6G07370
2	XM_743957	Rho guanyl nucleotide exchange factor	AFUA_7G04600
2	XM_741242	GABA permease	AFUA_4G01230
2,01	XM_748582	conserved fungal protein	AFUA_5G09640
2,02	XM_746145	conserved hypothetical protein	AFUA_6G13630
2,03	XM_743985	cell division control protein Cdc6, putative	AFUA_7G04310
2,04	XM_747498	ankyrin repeat protein	AFUA_1G12230
2,05	XM_750229	NDT80 / PhoG like DNA-binding family protein	AFUA_2G09890
2,08	XM_744430	ATP-depentend DNA helicase, putative	AFUA_2G03910
2,1	XM_742949	conserved hypothetical protein	AFUA_5G03010
2,11	XM_741899	ankyrin repeat protein	AFUA_8G02140
2,11	XM_750700	oxalate decarboxylase	AFUA_2G14610
2,12	XM_746283	metallo-beta-lactamase domain protein	AFUA_4G14570
2,13	XM_742971	nicotinamide nucleotide transhydrogenase	AFUA_5G02780
2,17	XM_741239	mitochondrial chaperone ATPase, Bcs1	AFUA_4G01260
2,17	XM_743997	amine oxidase	AFUA_7G04180
2,19	XM_741795	C6 transcription factor	AFUA_7G00410
2,22	XM_742349	MFS multidrug transporter	AFUA_8G06410
2,22	XM_746257	cytochrome P450 monooxygenase, putative	AFUA_4G14830

2,25	XM_741569	inositol kinase kinase, UvsB	AFUA_4G04760
2,26	XM_742126	carboxypeptidase S1	AFUA_8G04120
2,29	XM_744748	conserved hypothetical protein	AFUA_1G00910
2,31	XM_743698	hypothetical protein	AFUA_7G08240
2,32	XM_746259	cytochrome P450 monooxygenase, putative	AFUA_4G14810
2,34	XM_743888	conserved hypothetical protein	AFUA_7G05280
2,37	XM_742468	C2H2 transcription factor, Azf1	AFUA_6G05160
2,37	XM_744857	DNA mismatch repair protein Msh4, putative	AFUA_1G02000
2,41	XM_741712	DNA-directed polymerase kappa, putative	AFUA_7G01270
2,41	XM_744701	carboxypeptidase S1	AFUA_1G00420
2,43	XM_746230	beta-glucosidase	AFUA_6G14490
2,44	XM_742074	polyketide synthase	AFUA_8G00370
2,47	XM_747569	glycogen phosphorylase GlpV/Gph1, putative	AFUA_1G12920
2,48	XM_742592	iron-sulfur cluster-binding protein	AFUA_6G03920
2,5	XM_747898	alpha-glucosidase	AFUA_1G16250
2,52	XM_746174	adenylate-forming enzyme	AFUA_6G13920
2,53	XM_745679	2-oxoisovalerate dehydrogenase complex alpha subunit	AFUA_6G08830
2,54	XM_001481380	AAA family ATPase	AFUA_7G05752
2,55	XM_748892	Sad1/UNC domain protein	AFUA_5G06480
2,6	XM_745098	conserved hypothetical protein	AFUA_1G04430
2,63	XM_744025	conserved hypothetical protein	AFUA_7G03900
2,7	XM_743748	Rieske [2Fe-2S] domain protein	AFUA_7G06700
2,81	XM_743741	conserved hypothetical protein	AFUA_7G06770
3,16	XM_745725	class V chitinase	AFUA_6G09310
3,2	XM_001481427	cytochrome P450 monooxygenase, putative	AFUA_6G13945
3,21	XM_743766	acyl-CoA dehydrogenase	AFUA_7G06510
3,25	XM_746263	squalene-hopene-cyclase	AFUA_4G14770
3,26	XM_742050	dimethylallyl tryptophan synthase, putative	AFUA_8G00620
3,32	XM_742056	cytochrome P450 oxidoreductase, putative	AFUA_8G00560
3,42	XM_741206	ankyrin repeat protein	AFUA_4G01580
3,57	XM_744573	C6 transcription factor	AFUA_2G05360
3,67	XM_743779	maltase partial mRNA	AFUA_7G06380
3,67	XM_743620	cytochrome P450 monooxygenase, putative	AFUA_3G03930
3,89	XM_742070	methionine aminopeptidase, type II, putative	AFUA_8G00410
4,17	XM_743236	squalene-hopene-cyclase	AFUA_5G00110
4,37	XM_742059	alpha/beta hydrolase	AFUA_8G00530
4,42	XM_743235	cytochrome P450 oxidoreductase/alkane hydroxylase	AFUA_5G00120
4,77	XM_746895	conserved hypothetical protein	AFUA_4G08370
4,89	XM_748745	hypothetical protein	AFUA_5G07980
6,46	XM_742069	C6 finger transcription factor, putative	AFUA_8G00420
7,29	XM_744572	MFS transporter	AFUA_2G05350
7,7	XM_743903	O-methyltransferase	AFUA_7G05130

Tabelle: Vollständige Liste der differentiell regulierten Transkripte, Studie Δ GprD / Wildtyp (April 2008) sortiert nach „Fold change“

FC Δ GprD/ wt	Accession #	Description	Afu-Locus
0,18	XM_745158	sulfate transporter	AFUA_1G05020
0,2	XM_742633	flavin containing polyamine oxidase	AFUA_6G03510
0,2	XM_744617	dienelactone hydrolase	AFUA_2G05810
0,21	XM_001481527	conserved hypothetical protein	AFUA_4G14180
0,22	XM_743512	ankyrin repeat protein	AFUA_3G02830

0,23	XM_746314	hypothetical protein	AFUA_4G14250
0,23	XM_749026	flavin-binding monooxygenase, putative	AFUA_3G15050
0,23	XM_001481427	cytochrome P450 monooxygenase, putative	AFUA_6G13945
0,24	XM_001481591	NACHT domain protein	AFUA_2G00960
0,24	XM_745901	amino acid permease	AFUA_6G11100
0,27	XM_742426	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, putative	AFUA_8G07210
0,28	XM_746375	PE repeat family protein	AFUA_4G13630
0,29	XM_001481650	alpha-1,3-glucanase/mutanase, putative	AFUA_1G03352
0,3	XM_743570	ABC multidrug transporter SitT	AFUA_3G03430
0,3	XM_745377	6-phosphofructo-2-kinase 1	AFUA_1G07220
0,31	XM_746132	glutamate decarboxylase	AFUA_6G13490
0,32	XM_746384	potassium uptake transporter, putative	AFUA_4G13540
0,33	XM_742615	sodium P-type ATPase	AFUA_6G03690
0,34	XM_746800	extracellular dipeptidyl-peptidase Dpp4	AFUA_4G09320
0,34	XM_741893	proline permease	AFUA_8G02200
0,35	XM_743266	phosphoketolase	AFUA_3G00370
0,35	XM_749077	MFS multidrug transporter	AFUA_3G14560
0,35	XM_001481621	GYF domain protein	AFUA_2G13290
0,35	XM_743385	GMC oxidoreductase	AFUA_3G01580
0,35	XM_001481458	PTH11-like integral membrane protein	AFUA_5G11245
0,36	XM_747310	MFS multidrug transporter	AFUA_1G10370
0,36	XM_748083	pyruvate decarboxylase	AFUA_5G14810
0,37	XM_748932	ABC multidrug transporter Mdr1	AFUA_5G06070
0,38	XM_746826	phosphatidate cytidyltransferase, putative	AFUA_4G09060
0,38	XM_748190	carboxylesterase	AFUA_5G13710
0,39	XM_749419	pyruvate decarboxylase PdcA, putative	AFUA_3G11070
0,39	XM_745272	conserved predicted protein	AFUA_1G06160
0,4	XM_741860	extracellular lipase	AFUA_8G02530
0,41	XM_748550	67 kDa myosin-cross-reactive antigen family protein	AFUA_5G09970
0,41	XM_743910	FAD dependent oxidoreductase, putative	AFUA_7G05070
0,42	XM_747005	cAMP-mediated signaling protein Sok1	AFUA_4G07280
0,42	XM_743594	ABC multidrug transporter	AFUA_3G03670
0,42	XM_741516	hypothetical protein	AFUA_4G04230
0,42	XM_743086	MFS multidrug transporter	AFUA_5G01630
0,42	XM_747043	asparagine synthetase Asn2, putative	AFUA_4G06900
0,43	XM_750010	L-ornithine N5-oxygenase SidA	AFUA_2G07680
0,44	XM_746162	flavin-binding monooxygenase, putative	AFUA_6G13790
0,44	XM_742021	UDP-glucose dehydrogenase Ugd1, putative	AFUA_8G00920
0,44	XM_743571	MFS siderophore iron transporter, putative	AFUA_3G03440
0,44	XM_744236	conserved hypothetical protein	AFUA_2G01940
0,45	XM_742344	alpha-1,3-glucanase	AFUA_8G06360
0,45	XM_748009	CP2 transcription factor	AFUA_1G17350
0,45	XM_743591	MFS siderochrome iron transporter MirB	AFUA_3G03640
0,45	XM_742887	mitochondrial export translocase Oxa1	AFUA_5G03640
0,45	XM_750050	phospholipid metabolism enzyme regulator	AFUA_2G08080
0,46	XM_742638	conserved hypothetical protein	AFUA_6G03460
0,46	XM_746332	glycosyl transferase	AFUA_4G14070
0,46	XM_742825	homocysteine synthase CysD	AFUA_5G04250
0,47	XM_746304	kelch repeat protein	AFUA_4G14350
0,47	XM_747115	branched-chain amino acid aminotransferase, cytosolic	AFUA_4G06160
0,47	XM_746828	high affinity methionine permease	AFUA_4G09040
0,47	XM_747652	C2H2 transcription factor, Rpn4 putative	AFUA_1G13750
0,47	XM_749775	isoamyl alcohol oxidase	AFUA_3G07410
0,48	XM_742034	conserved hypothetical protein	AFUA_8G00780
0,48	XM_749318	trehalose synthase, Ccg-9, putative	AFUA_3G12100
0,48	XM_744066	Amid-like NADH oxidoreductase, putative	AFUA_2G00230
0,48	XM_741302	aryl-alcohol dehydrogenase, putative	AFUA_4G00610
0,48	XM_744061	neutral amino acid permease	AFUA_2G00180
0,48	XM_747876	conserved hypothetical protein	AFUA_1G16030
0,48	XM_748458	conserved hypothetical protein	AFUA_5G10960

0,48	XM_749633	tubulin-specific chaperone c, putative	AFUA_3G08900
0,49	XM_743104	NADH-dependent flavin oxidoreductase	AFUA_5G01450
0,49	XM_747822	C6 transcription factor, UaY, putative	AFUA_1G15470
0,49	XM_742547	molecular chaperone, ABC1, putative	AFUA_6G04380
0,49	XM_742789	conserved hypothetical protein	AFUA_6G01950
0,5	XM_745022	conserved hypothetical protein	AFUA_1G03650
0,5	XM_744302	conserved hypothetical protein	AFUA_2G02600
0,5	XM_750121	amino acid permease, Dip5, putative	AFUA_2G08800
0,5	XM_743773	F-box domain protein	AFUA_7G06440
0,5	XM_743827	MOSC domain protein	AFUA_7G05900
2	XM_741821	FAD-dependent monooxygenase, putative	AFUA_7G00150
2	XM_742594	F-box domain protein	AFUA_6G03900
2	XM_747823	MFS multidrug transporter	AFUA_1G15490
2,01	XM_747345	conserved hypothetical protein	AFUA_1G10730
2,03	XM_742763	cytochrome P450 monooxygenase, putative	AFUA_6G02210
2,03	XM_726410	conserved hypothetical protein	AFUA_6G00520
2,03	XM_746537	2-oxo acid dehydrogenases acyltransferase	AFUA_4G12010
2,04	XM_750296	amino acid permease	AFUA_2G10560
2,04	XM_749068	LipA and NB-ARC domain protein	AFUA_3G14650
2,05	XM_747010	RecQ family helicase RecQ	AFUA_4G07230
2,05	XM_743236	squalene-hopene-cyclase	AFUA_5G00110
2,08	XM_749213	conserved hypothetical protein	AFUA_3G13160
2,09	XM_747086	pentafunctional AROM polypeptide, putative	AFUA_4G06460
2,1	XM_745323	conserved hypothetical protein	AFUA_1G06670
2,1	XM_741932	conserved hypothetical protein	AFUA_8G01810
2,11	XM_746614	xanthine dehydrogenase HxA, putative	AFUA_4G11220
2,12	XM_750700	oxalate decarboxylase	AFUA_2G14610
2,12	XM_741819	dimethylallyl tryptophan synthase GliD1	AFUA_7G00170
2,13	XM_742592	iron-sulfur cluster-binding protein	AFUA_6G03920
2,14	XM_742090	dimethylallyl tryptophan synthase FtmPT1	AFUA_8G00210
2,16	XM_745248	conserved hypothetical protein	AFUA_1G05910
2,17	XM_749409	CP2 transcription factor	AFUA_3G11170
2,17	XM_744851	conserved hypothetical protein	AFUA_1G01940
2,17	XM_743888	conserved hypothetical protein	AFUA_7G05280
2,18	XM_745537	conserved hypothetical protein	AFUA_6G07370
2,21	XM_742468	C2H2 transcription factor, Azf1, putative	AFUA_6G05160
2,21	XM_743861	sugar transporter family protein	AFUA_7G05550
2,21	XM_750680	conserved hypothetical protein	AFUA_2G14400
2,23	XM_744715	Pfs domain protein	AFUA_1G00560
2,23	XM_745679	2-oxoisovalerate dehydrogenase complex alpha subunit	AFUA_6G08830
2,24	XM_748936	conserved hypothetical protein	AFUA_5G06030
2,26	XM_748756	conserved hypothetical protein	AFUA_5G07870
2,27	XM_742101	aspartate-tRNA ligase	AFUA_8G00100
2,27	XM_749022	adenosine deaminase family protein	AFUA_3G15090
2,27	XM_746762	C6 sexual development transcription factor NosA	AFUA_4G09710
2,28	XM_743235	cytochrome P450 oxidoreductase/alkane hydroxylase	AFUA_5G00120
2,3	XM_747788	dsDNA-dependent ATPase, Rad54b, putative	AFUA_1G15120
2,31	XM_748651	isovaleryl-CoA dehydrogenase lvdA, putative	AFUA_5G08930
2,33	XM_742289	cellobiose dehydrogenase	AFUA_8G05805
2,33	XM_744701	carboxypeptidase S1	AFUA_1G00420
2,36	XM_747569	glycogen phosphorylase GlpV/Gph1, putative	AFUA_1G12920
2,38	XM_742214	beta-N-acetylhexosaminidase NagA, putative	AFUA_8G05020
2,41	XM_744436	DUF52 domain protein	AFUA_2G03970
2,42	XM_745570	phosphoenolpyruvate carboxykinase AcuF	AFUA_6G07720
2,43	XM_742127	C6 transcription factor, Ctf1b, putative	AFUA_8G04130
2,5	XM_746604	conserved hypothetical protein	AFUA_4G11320
2,51	XM_750655	endo-arabinanase	AFUA_2G14150
2,55	XM_750807	DUF323 domain protein	AFUA_2G15650
2,58	XM_746178	FAD-dependent monooxygenase, PaxM	AFUA_6G13970

2,58	XM_744636	NAD ⁺ dependent glutamate dehydrogenase	AFUA_2G06000
2,58	XM_001481380	AAA family ATPase	AFUA_7G05752
2,59	XM_742317	flavohepotein	AFUA_8G06080
2,63	XM_741239	mitochondrial chaperone ATPase, Bcs1	AFUA_4G01260
2,64	XM_744025	conserved hypothetical protein	AFUA_7G03900
2,69	XM_001481557	DEAD/DEAH box helicase	AFUA_3G06922
2,73	XM_741899	ankyrin repeat protein	AFUA_8G02140
2,73	XM_746261	cytochrome P450 monooxygenase, putative	AFUA_4G14790
2,76	XM_742972	conserved hypothetical protein	AFUA_5G02770
2,79	XM_741242	GABA permease	AFUA_4G01230
2,97	XM_742312	alpha-1,3-glucanase	AFUA_8G06030
2,98	XM_750762	conserved hypothetical protein	AFUA_2G15200
3,03	XM_742779	conserved hypothetical protein	AFUA_6G02050
3,04	XM_742092	cytochrome P450	AFUA_8G00190
3,1	XM_749696	hypothetical protein	AFUA_3G08250
3,14	XM_001481603	WD repeat protein	AFUA_2G04360
3,14	XM_742056	cytochrome P450 oxidoreductase, putative	AFUA_8G00560
3,16	XM_742393	MFS sugar transporter	AFUA_8G06870
3,22	XM_745072	aspartate aminotransferase, putative	AFUA_1G04160
3,26	XM_726386	extracellular arabinanase	AFUA_6G00770
3,34	XM_742126	carboxypeptidase S1	AFUA_8G04120
3,39	XM_742767	metalloreductase transmembrane component	AFUA_6G02170
3,51	XM_745116	RING finger domain protein, putative	AFUA_1G04600
3,52	XM_742988	cytochrome P450	AFUA_5G02610
3,56	XM_746004	conserved hypothetical protein	AFUA_6G12180
3,64	XM_746257	cytochrome P450 monooxygenase, putative	AFUA_4G14830
3,65	XM_749315	conserved hypothetical protein	AFUA_3G12130
3,65	XM_745234	beta-glucosidase	AFUA_1G05770
3,71	XM_749700	conserved hypothetical protein	AFUA_3G08210
3,76	XM_744573	C6 transcription factor	AFUA_2G05360
3,79	XM_742070	methionine aminopeptidase, type II, putative	AFUA_8G00410
3,8	XM_742050	dimethylallyl tryptophan synthase, putative	AFUA_8G00620
3,89	XM_745992	MAK1-like monooxygenase	AFUA_6G12060
3,96	XM_745993	FAD binding domain protein	AFUA_6G12070
3,97	XM_746174	adenylate-forming enzyme	AFUA_6G13920
4,18	XM_741206	ankyrin repeat protein	AFUA_4G01580
4,19	XM_742349	MFS multidrug transporter	AFUA_8G06410
4,42	XM_742641	C6 finger domain protein	AFUA_6G03430
4,62	XM_745098	conserved hypothetical protein	AFUA_1G04430
4,7	XM_746258	transferase family protein	AFUA_4G14820
4,82	XM_743779	maltase partial mRNA	AFUA_7G06380
4,83	XM_743741	conserved hypothetical protein	AFUA_7G06770
4,94	XM_749305	conserved hypothetical protein	AFUA_3G12230
4,97	XM_742595	spore-specific catalase CatA	AFUA_6G03890
5,42	XM_742059	alpha/beta hydrolase	AFUA_8G00530
5,51	XM_748308	adenylate-forming enzyme AfeA	AFUA_5G12510
5,99	XM_747933	C2H2 type conidiation transcription factor BrlA	AFUA_1G16590
6,47	XM_743620	cytochrome P450 monooxygenase, putative	AFUA_3G03930
7,01	XM_746145	conserved hypothetical protein	AFUA_6G13630
7,23	XM_746895	conserved hypothetical protein	AFUA_4G08370
7,43	XM_744572	MFS transporter	AFUA_2G05350
8,5	XM_742069	C6 finger transcription factor, putative	AFUA_8G00420
8,73	XM_743903	O-methyltransferase	AFUA_7G05130
9,6	XM_748745	hypothetical protein	AFUA_5G07980
10,93	XM_001481541	conserved hypothetical protein	AFUA_3G02260
11,02	XM_741915	conserved hypothetical protein	AFUA_8G01980
12,11	XM_746259	cytochrome P450 monooxygenase, putative	AFUA_4G14810
18,13	XM_746263	squalene-hopene-cyclase	AFUA_4G14770